

Aus dem Institut für Virologie  
des medizinischen Zentrums für Hygiene und Mikrobiologie  
mit Medizinal-Untersuchungsamt  
der Philipps-Universität Marburg



Direktor: Prof. Dr. S. Becker

# **Charakterisierung des Spike-Proteins des Schweren Akuten Atemnotsyndrom Coronavirus (SARS-CoV)**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg

verlegt von

**Jens Kursawe**

aus Munster

Marburg an der Lahn  
August 2008

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurde von Mai 2004 bis Dezember 2007 im Institut für Virologie, Direktor: Prof. Dr. H.D. Klenk, Fachbereich Medizin, der Phillips-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Garten durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als  
Dissertation angenommen am

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Garten

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Erhard Bremer

Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am

Für Meine Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Schwere akute Atemnotsyndrom (SARS)</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Klinik und Pathogenese	3
<b>1.2</b>	<b>Coronaviren</b>	<b>4</b>
1.2.1	Allgemein	4
1.2.2	Taxonomie	5
<b>1.3</b>	<b>Das SARS Coronavirus</b>	<b>6</b>
1.3.1	Morphologie	6
1.3.2	Genomaufbau	8
1.3.3	Replikationszyklus	11
1.3.4	Das Spike-Protein	13
<b>1.4</b>	<b>Aktivierung viraler Oberflächenproteine durch proteolytische Spaltung</b>	<b>14</b>
<b>1.5</b>	<b>Endosomale/Lysosomale Proteasen</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>17</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Geräte</b>	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>Kits</b>	<b>21</b>
<b>3.4</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>21</b>
<b>3.5</b>	<b>Enzyme</b>	<b>23</b>
<b>3.6</b>	<b>Antikörper</b>	<b>24</b>
3.6.1	Kommerzielle Antikörper	24
3.6.2	SARS CoV Spike-Protein spezifische Antikörper	24
<b>3.7</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>25</b>
3.7.1	Oligonukleotide für die Sequenzierung	25



3.7.2	Mutagenese-Oligonukleotide	26
<b>3.8</b>	<b>Vektoren</b>	<b>27</b>
<b>3.9</b>	<b>Prokaryotische Zellen</b>	<b>28</b>
3.9.1	Bakterien	28
3.9.2	Medien und Zusätze für die Bakterienkultur	28
<b>3.10</b>	<b>Antibiotika</b>	<b>29</b>
<b>3.11</b>	<b>Eukaryotische Zellen</b>	<b>29</b>
3.11.1	Medium und Zusätze für die Zellkultur	29
<b>3.12</b>	<b>Viren</b>	<b>30</b>
<b>3.13</b>	<b>Puffer für Zellkultur</b>	<b>30</b>
<b>3.14</b>	<b>Puffer für Natriumdodecylsulfat-PAGE (SDS-PAGE)</b>	<b>31</b>
<b>3.15</b>	<b>Puffer für die Übertragung von in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf Nitrozellulose</b>	<b>32</b>
<b>3.16</b>	<b>Puffer für Agarosegelelektrophorese</b>	<b>32</b>
<b>3.17</b>	<b>Puffer zur Plasmid-DNA-Isolierung (Fa. QIAGEN)</b>	<b>33</b>
<b>3.18</b>	<b>Puffer für die Immunfluoreszenz</b>	<b>33</b>
<b>4.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>34</b>
4.1.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	34
4.1.2	Passagieren von eukaryotischen Zellen	34
4.1.3	Einfrieren von eukaryontischen Zellen	35
4.1.4	Auftauen von eukaryontischen Zellen	35
4.1.5	Lyse von eukaryontischen Zellen	36
4.1.6	Tranfektion eukaryontischer Zellen	36
4.1.7	Herstellung stabil exprimierender Zelllinien	37
4.1.8	Herstellung von SARS Coronavirus infizierten Zelllysaten	38
4.1.9	Virusreinigung	39
4.1.10	Fusionsassay	39
<b>4.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>40</b>

4.2.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerasekettenreaktion	40
4.2.2	Rekombinante PCR (nach Higuchi et al. 1988)	40
4.2.3	Mutagenese von DNA mittels Quickchange Multi	42
4.2.4	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäure im Agarosegel	43
4.2.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	44
4.2.6	Hybridisierungs- und Auffüllreaktion	45
4.2.7	Analytischer Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	46
4.2.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	47
4.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase	47
4.2.10	Transformation	48
4.2.10.1	Herstellung Hitzeschock-kompetender Bakterien mittels Calciumchlorid	49
4.2.10.2	Transformation Hitzeschock-kompetenter Bakterien mit Plasmid DNA	49
4.2.11	Kultivierung von Bakterien	50
4.2.12	Herstellung einer Übernachtskultur	50
4.2.13	Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	51
4.2.13.1	Plasmid-DNA Isolierung im kleinen Maßstab	51
4.2.13.2	Plasmid-DNA Isolierung im großen Maßstab	52
4.2.14	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	53
4.2.15	Sequenzierung von DNA nach Sanger et al. (1977)	54
<b>4.3</b>	<b>Biochemische- und Immunologische-Methoden</b>	<b>55</b>
4.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
4.3.2	Elektroblotting auf Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membranen	56
4.3.3	Immunochemischer Nachweis von Proteinen auf NC- bzw. PVDF-Membran	57

4.3.4	Nachweis mittels Chemoluminiszenz_____	58
4.3.5	Nachweis mittels Odyssey®–Infrarot-Imaging System_____	59
4.3.6	Nachweis exprimierter Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz_____	59
4.3.7	Endoglykosidasenbehandlung_____	61
4.3.8	In-vitro Peptidspaltungstest_____	61
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE_____</b>	<b>63</b>
<b>5.1</b>	<b>Herstellung polyklonaler polyspezifischer Antiseren gegen das SARS CoV S-Protein_____</b>	<b>63</b>
<b>5.2</b>	<b>Identifikation und Charakterisierung des SARS CoV S-Proteins mit etablierten und noch zu testenden Antikörpern_____</b>	<b>64</b>
5.2	Fluoreszenz-immunologische Darstellung des S-Protein in SARS CoV infizierten Vero-Zellen_____	64
5.2.1	Fluoreszenz-immunologische Darstellung des S-Protein in SARS CoV infizierten Vero-Zellen_____	64
5.2.2	Immunoblot zur Identifikation des S-Protein und seiner Untereinheiten in infizierten Vero-Zellen_____	66
5.2.3	Identifikation des S-Proteins und seiner Spaltfragmente aus sedimentierten SARS CoV_____	71
5.2.4	Untersuchung zur Glykosylierung des S-Proteins und seiner Spaltfragmente durch Behandlung mit Endoglykosidasen_____	73
5.3	Etablierung und Charakterisierung einer solitär SARS CoV S-Protein exprimierenden Zelllinie_____	75
5.3.1	Fluoreszenz-immunologische Darstellung des S-Proteins aus solitär exprimierenden CHO-Zellen_____	75
5.3.2	Immunoblot zur Identifikation des S-Proteins in solitär exprimierenden CHO-Zellen_____	77

5.3.3	Untersuchung zur Glykosylierung des solitär exprimierten S-Proteins und der Spaltfragmente durch Behandlung mit Endoglykosidasen	79
5.4	<b>Identifikation der Mehrfachspaltung des S-Proteins</b>	<b>80</b>
5.5	<b>Substitutionsanalyse der potentiellen Spaltstellen des S-Proteins</b>	<b>81</b>
5.6	<b>Untersuchung zur Spike-Protein Spaltung durch Endoproteasen mittels in-vitro Peptidspaltungstest</b>	<b>84</b>
5.7	<b>Fusionsaktivität von SARS CoV S-Protein</b>	<b>88</b>
5.8	<b>Untersuchung der Fusions-inhibitorischen Wirkung von Peptiden</b>	<b>91</b>
5.9	<b>Charakterisierung des S-Proteins im VSV <math>\Delta</math>G System</b>	<b>93</b>
5.9.1	Identifikation des S-Proteins und seiner Spaltprodukte aus VSV $\Delta$ G S-Protein Viren	94
5.9.2	Nachspaltung des VSV $\Delta$ G Spike mit potentiellen Endoproteasen	95
5.9.3	Infektionsstudien mit dem VSV $\Delta$ G S-Protein Virus	96
5.9.4	Identifikation der Spaltung des S-Proteins via Serinproteasen des Respirationstrakts	98
5.9.5	Identifikation des S-Proteins und seiner Spaltprodukte aus VSV $\Delta$ G S-Protein Viren	98
6.	<b>DISKUSSION</b>	<b>100</b>
6.1	<b>Identifikation des Spike-Proteins und der aus der Primärsequenz deduzierten Spaltstellen</b>	<b>100</b>
6.2	<b>Prozessierung des Spike-Proteins durch zelluläre Proteasen</b>	<b>103</b>
6.3	<b>Einfluss der Prozessierung des Spike-Proteins auf die Zell-Zell-Fusion</b>	<b>105</b>
6.4	<b>Inhibition der Fusion</b>	<b>107</b>
6.5	<b>Einfluss der Prozessierung des Spike-Proteins auf die Infektion</b>	<b>108</b>

<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b><u>109</u></b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b><u>111</u></b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG</b>	<b><u>122</u></b>
<b>9.1</b>	<b>Zusammenfassung der getesteten Antiseren</b>	<b><u>122</u></b>
<b>9.2</b>	<b>Übersicht welcher Antikörper welches S-Protein Spaltfragment detektiert</b>	<b><u>123</u></b>
	Abkürzungsverzeichnis	<u>124</u>
	Abkürzungen der Aminosäuren	<u>126</u>
	Vorträge	<u>127</u>
	Poster Präsentationen	<u>128</u>
	Lebenslauf	<u>129</u>
	Verzeichnis der Akademischen Lehrer	<u>132</u>
	Danksagung	<u>133</u>
	Ehrenwörtliche Erklärung	<u>134</u>

# **1 EINLEITUNG**

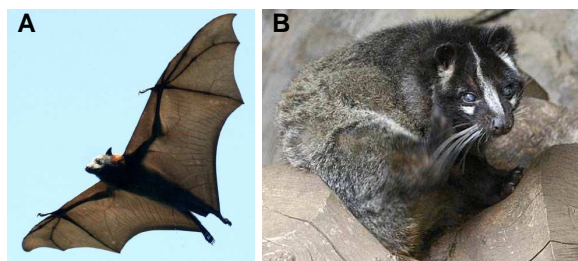
## **1.1 Das Schwere akute Atemnotsyndrom (SARS)**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Im November 2002 trat in der südchinesischen Provinz Guangdong erstmals das schwere akute Atemnotssyndrom auf. Von dort aus breitete es sich zunächst in Asien aus. Die Krankheit zeichnete sich durch eine atypische Lungenentzündung aus, die zunächst keinem bekannten Erreger zugeordnet werden konnte. Am 14. Februar 2003 meldete das chinesische Gesundheitsministerium der Weltgesundheitsorganisation (WHO) den Ausbruch einer atypischen Lungenentzündung in der Region Guangdong. Ein an dieser atypischen Lungenentzündung erkrankter 65-jähriger Arzt aus Guangdong reiste am 21. Februar nach Honkong und infizierte dort in einem Hotel mehrere Personen. Dies setzte die globale Ausbreitung der Infektion in Gang. Für die WHO bestätigte sich durch diesen Fall der Verdacht, dass die SARS-Fälle mit der seit November 2002 in Guangdong grassierenden Epidemie atypischer Lungenentzündungen in engem Zusammenhang standen. Dr. Carlo Urbani, ein Spezialist für Infektionskrankheiten, meldete der WHO am 28. Februar 2003 einen Fall dieser atypischen Lungenentzündung aus dem Französischen Krankenhaus von Hanoi in Vietnam. Urbani verstarb später in Thailand selber an den Folgen der Infektion. Am 15. März 2003 wurden ein aus Singapur kommender Arzt, seine Frau und seine Mutter in das Universitätsklinikum von Frankfurt am Main mit dem Verdacht auf SARS eingeliefert. Zur gleichen Zeit traten SARS Verdachtsfälle in Toronto Kanada auf. Um die Weltweite Ausbreitung der Erkrankung zu bekämpfen, wurde von der WHO am 17. März 2003 ein internationales Treffen von Spezialisten einberufen. Durch die dort festgelegten Maßnahmen, wie Isolierung der Patienten und die Warnung der Öffentlichkeit, konnte die

Ausbreitung der unbekannten Infektionskrankheit eingedämmt werden. Das für die Erkrankung verantwortliche Virus wurde am 24. März 2003 als eine neue Form der Coronaviren identifiziert (Drosten et al., 2003; Homes et al., 2003; Ksiazek et al., 2003; Peiris et al., 2003; Marra et al., 2003; Rota et al., 2003). Am 15. Mai 2003 wurde schließlich bestätigt, dass das SARS Coronavirus (SARS CoV) die Koch'schen Postulate erfüllt (Fouchier et al. 2003). Von diesem Zeitpunkt an galt SARS CoV als Erreger der atypischen Lungenentzündung (Kuiken et al., 2003). Seit Juni 2003 nahm die Neuerkrankungsrate so stark ab, dass von einem Ende der SARS-Epidemie gesprochen werden konnte. Nach den Zahlen der WHO waren bis zum 01. Juli 2003 weltweit 8.445 Menschen erkrankt und 812 Personen gestorben.

Mit einem erneuten Ausbruch der Krankheit SARS muss jederzeit gerechnet werden. Am 22. Mai 2003 äußerten Wissenschaftler der Universität von Hongkong den Verdacht, dass das Virus von einer Schleichkatzenart, der so genannten Zibetkatze (*Pagima larvata*) (Abb. 1) auf den Menschen übertragen wurde (Guan et al., 2003). Die Zibetkatze gilt in Südchina als eine Delikatesse und steht daher im engen Kontakt zum Menschen. Im Januar 2004 wurden auch Ratten, Dachse und Waschbären als potentiell tierisches Reservoir für das Virus diskutiert. Später im Oktober 2004 wurden dann in Flughunden der Gattung *Miniotperus spp.* (Abb. 1) Coronaviren entdeckt. Seit dieser Zeit werden auch diese Tiere als Reservoir des SARS CoV diskutiert (Poon et al., 2004).



**Abb. 1: Tierisches Reservoir von SARS CoV**

Bild A zeigt einen Flughund der Spezies *Miniopterus*. Bild B zeigt eine Schleichkatze der Art *Paguma larvata*. Beide sind Träger von Coronaviren und werden als tierisches Reservoir des SARS CoV diskutiert.

Die genauen Mechanismen die zur Übertragung des Virus vom Tier auf den Menschen führen sind bis heute nicht bekannt. Durch Mutationen im Oberflächenglykoprotein (Spike-Protein) des Virus wurde die Übertragung vom Tier auf den Menschen möglich. Dies bildet auch die Grundlage für die Übertragung von Mensch zu Mensch, welche zur Epidemie 2003 führte (Poon et al., 2004). Die Mutation erfolgte im Spike-Protein genauer in der S1 Domäne. Diese enthält die Wirtszellrezeptorbindungsstelle und Virus neutralisierende Epitope. Vermutlich sind viele Tiere in China SARS CoV infiziert, so dass ein neuer Ausbruch der Krankheit durch eine weitere Mutation denkbar ist (Simmons et al., 2005; Guan et al., 2004). Im Januar 2004 sind in Singapur zwei weitere SARS Fälle als Folge einer Laborinfektion aufgetreten (Schmitz und Dorsten, 2004). Dies verdeutlicht nochmals die hohe Kontagiosität des SARS Coronavirus.

### **1.1.2 Klinik und Pathogenese**

SARS ist eine virusinduzierte Pneumonie. Als Inkubationszeit gelten 2-10 Tage (Lee et al., 2003). Als Symptome treten hohes Fieber, trockener Husten, Atemnot, Kurzatmigkeit und Kopfschmerzen auf. Frühe Röntgenaufnahmen der Lunge zeigen kleine fokale einseitige diffuse interstitielle Infiltrate. Diese können sich rasch auf den anderen Lungenflügel ausbreiten. Bei einigen SARS-Patienten können Röntgenaufnahmen der Lunge jedoch während des gesamten Krankheitsverlaufs auch unauffällig bleiben (Zambon et al., 2003). Hypoxämie, Lymphopenie und die leichte Erhöhung des Aminotransferaseniveaus sind weitere Charakteristika von SARS. In der ersten Woche der Erkrankung kann es zu einer spontanen Besserung der Symptome kommen, die dann jedoch von einer rapiden Verschlechterung des Gesundheitszustands gefolgt wird. Während dieser Zeit kann es durch die alveolären Schäden zu einer progressiven respiratorischen Insuffizienz kommen, die zum Tod des Patienten führt (Avendano et al., 2003; Booth



et al., 2003). Die Sterberate von SARS ist stark abhängig vom allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten und seinem Alter. Ohne Einbeziehung dieser Kriterien liegt sie weltweit bei rund 10%. Die Übertragung der Krankheit findet nachweislich über eine Tröpfcheninfektion statt. Mittlerweile kann nicht mehr ausgeschlossen werden, dass sich das SARS CoV auch über größere Entfernungen über die Luft, über das Trinkwasser, Fäkalien oder sogar die Klimaanlage verbreiten kann. Nach dem derzeitigen Wissensstand überlebt das SARS CoV unter normalen Bedingungen außerhalb eines Organismus mindestens 24 Stunden. Im Nasopharynxsekret, Urin und Kot von Patienten ist das Virus noch 10-21 Tage nach der Infektion nachweisbar (Peiris et al., 2003).

## **1.2 Coronaviren**

### **1.2.1 Allgemein**

Coronaviren sind weltweit verbreitet und verursachen im Menschen leichte respiratorische oder auch gastrointestinale Erkrankungen. Daher werden bis zu 30% der Erkältungskrankheiten im Menschen den Coronaviren zugeschrieben. Bei Tieren jedoch treten meist schwere Formen von respiratorischen, sowie gastrointestinalen Erkrankungen auf und sind daher in der Viehzucht von Schweinen und Geflügel sehr gefürchtet (Holmes, 2003). Coronaviren sind meist sehr wirtsspezifisch.

Die Einteilung der Coronaviren erfolgt aufgrund von serologischen und phylogenetischen Analysen in 3 Gruppen, wobei das SARS-Coronavirus entfernt verwandt mit der zweiten Gruppe ist. (Eickmann et al., 2003; Snijder et al., 2003).

### 1.2.2 Taxonomie

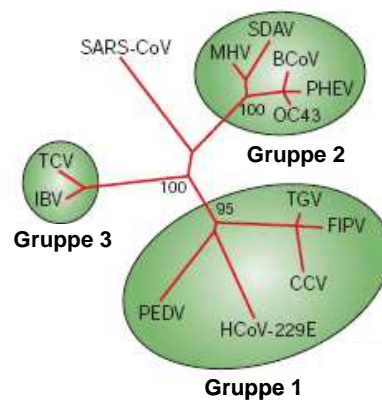
Das SARS-Coronavirus gehört zur Familie der *Coronaviridae*, die zusammen mit den Virusfamilien der *Arteriviridae*, *Toroviridae* und *Roniviridae* der Ordnung *Nidovirales* angehören (Gorbalenya et al., 2006). Die *Coronaviridae* werden aufgrund von phylogenetischen Analysen, basierend auf Vergleiche der Polymerasegene und der S1-Domäne der Oberflächenglykoproteine in 3 Gruppen von Coronaviren eingeteilt (Tabelle 1).

**Tabelle 1:**

<b>Gruppe</b>	<b>Vertreter</b>
Gruppe1	Humanes Coronavirus (HCoV-229E) Schweine Diarrhoe Virus (PEDV) Katzen Peritonitis Virus (FIPV) Übertragbares Gastroenteritis Virus (TGV) Hunde Coronavirus (CCV)
Gruppe2	Maus Hepatitis Virus (MHV)* Rinder Coronavirus (BCoV) Humanes Coronavirus (HCoV-OC43) Sialodacryoadenitis Virus der Ratte (SDAV) hämaglutinierende Encephalomyelitis-Virus der Schweine (PHEV)
Gruppe3	Vogel Bronchitis Virus (IBV)* Truthahn Coronavirus (TCV)*

\* Spike-Protein wird in S1 und S2 Domäne gespalten

Die Analysen der SARS-CoV Gene zeigt, dass es sich von allen 3 Gruppen der bisher bekannten Coronaviren deutlich unterscheidet, jedoch am meisten Ähnlichkeit zu den Coronaviren der Gruppe 2 (Abb.2) aufweist (Holmes, 2003; Stadler et al., 2003).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft des SARS CoV zu anderen Coronaviren**

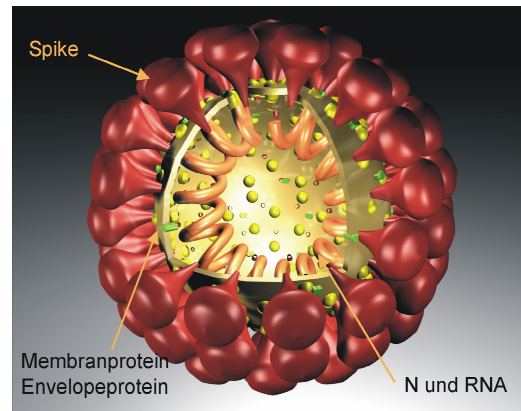
Basierend auf Sequenz vergleichenden Analysen der Polymerase Proteine und der S1-Domäne der Oberflächenglykoproteine der Coronaviren, zeigt sich, dass sich das SARS CoV von allen 3 Gruppen der bisher bekannten Coronaviren unterscheidet. Es weist jedoch am meisten Ähnlichkeit zu den Coronaviren der Gruppe 2 auf (Stadler et al., 2003)

## 1.3 Das SARS Coronavirus

### 1.3.1 Morphologie

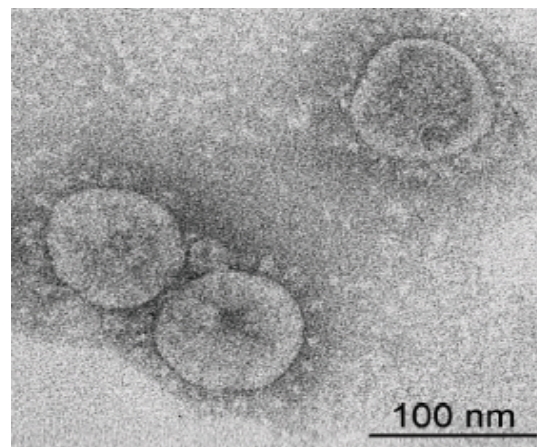
Die membranumhüllten Virionen haben einen Durchmesser von 60 bis 130nm (Ksiazek et al., 2003) und sind pleomorph. Im Inneren des Partikels liegt das helikale einzelsträngige plusstrangorientierte RNA-Genom assoziiert mit dem N-Protein als Nukleokapsid vor. Die Helix hat einen Durchmesser von 10 bis 20nm. Definierte Aminosäuren im N-Protein interagieren mit der carboxyterminalen Domäne des in die Membran eingelagerten glykosylierten M-Proteins. Über diese Proteinwechselwirkung ist das Nukleokapsid an die Innenseite der Membran assoziiert. Neben dem M-Protein sind noch zwei weitere Proteine in die Membran eingelagert. Das in geringer Menge vorhandene E-Protein, das als Dimer vorliegt und den Viren die hämagglutinierende

Aktivität verleiht und das ebenfalls glykosylierte S-Protein. Ein dreidimensionales Model eines SARS Coronavirus wird in Abb. 3 gezeigt. Das S-Protein liegt in keulenförmigen Homotrimeren vor (Song et al., 2004), die etwa 20nm aus der Membranoberfläche herausragen und für das typische Erscheinungsbild der Coronaviren im Elektronenmikroskop (EM) (Abb. 4) verantwortlich sind (Lai et al., 1997).



**Abb. 3: Model eines SARS Coronavirus**

Von innen nach außen sind folgende Virusbestandteile dargestellt der Nukleokapsidkomplex bestehend aus dem Nukleoprotein (N) und der RNA, dann die in der Membran liegenden Proteine Envelope-, Membran-, und Spike-Protein.



**Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme freier, pleomorpher-Coronaviren**

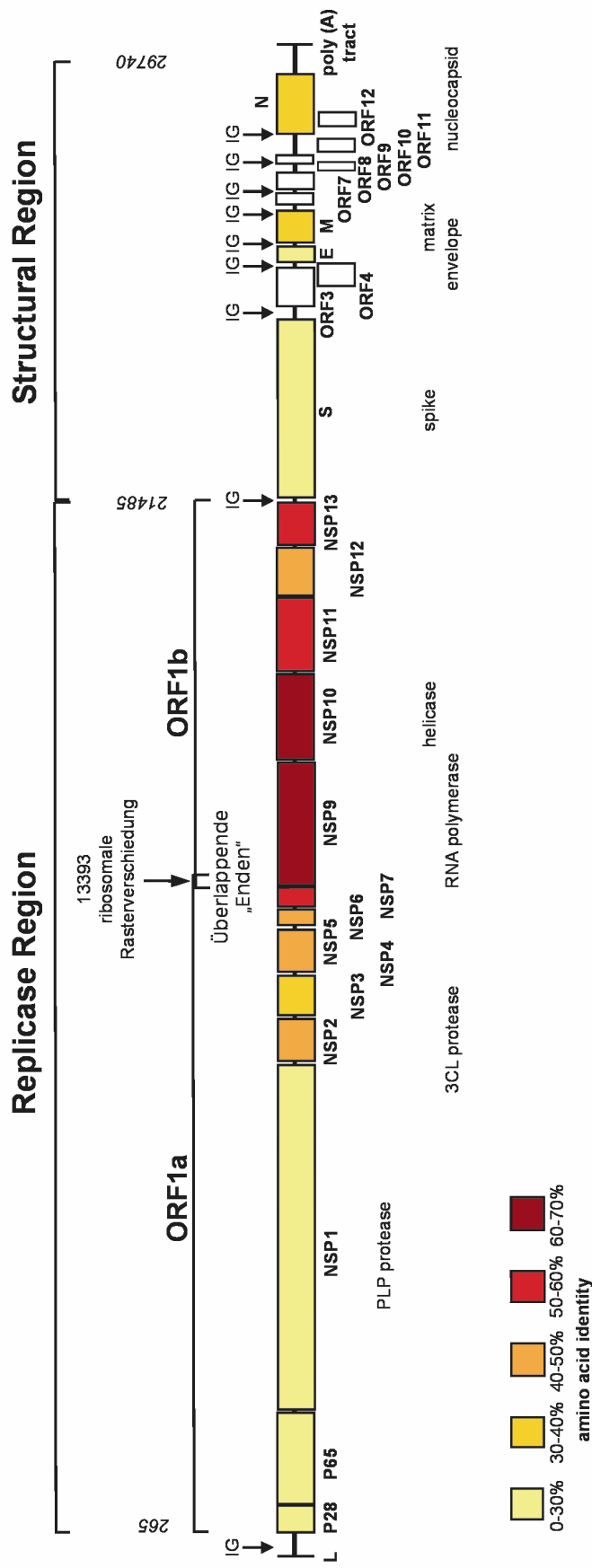
Die Viren wurden in Vero-Zellen angezogen und über einen Rohrzuckergradienten gereinigt, anschließend mit Phosphorwolframsäure negativ kontrastiert und an einem Elektronenmikroskop (EM101; Zeiss) einzelne Viruspartikel dargestellt. Zum Größenvergleich ist ein 100nm Balken angegeben. Die Abbildung wurde mir freundlicherweise von Frau Dr. L. Kolesnikova, Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg, zur Verfügung gestellt.

### 1.3.2 Genomaufbau

Das 29750 Nukleotide große polycistronische Plusstrang- RNA- Genom der Coronaviren stellt eines der größten Genome aller bekannten RNA-Viren dar. Die RNA ist infektiös und kodiert 13 offene Leserahmen (ORF, *open reading frame*), die für Struktur- und Nichtstrukturproteine codieren (Abb. 5). Der am 5' Ende des Genoms gelegene offene Leserahmen ORF1 nimmt dabei den größten Teil ein und wird in die Untereinheiten ORF1a und ORF1b eingeteilt. Der ORF 1b überlappt mit dem ORF 1a in einem kleinen Bereich und kann durch einen ribosomalen Leserasterschub (*frameshift*) während der Translation abgelesen werden. Dieser Leserasterschub erfolgt aufgrund einer definierten Sekundärstruktur der RNA, die am Ende des ersten Leserahmens eine Haarnadelstruktur ausbildet. Diese Leserahmenverschiebung kommt in 20-30% der Translationsereignisse vor und ermöglicht die Synthese des offenen Leserahmens. Beide ORF's kodieren zunächst für große Vorläuferproteine der Replikationsmaschinerie. Diese Vorläuferpolyproteine werden synthetisiert und anschließend durch die Aktivität einer chymotrypsinähnlichen Cysteinprotease, die im Vorläuferpolyprotein enthalten ist, autoproteolytisch in ihre funktionsfähigen Untereinheiten gespalten (Gorbalenya et al., 2006; Ziebuhr et al., 2000). Weitere Enzyme, die in den beiden Polyproteinen der ORF's 1a und 1ab codiert werden, sind eine aktive RNA-abhängige RNA-Polymerase, eine Helikase mit Zink-bindender Domäne und ein Magnesium-abhängiges Enzym, namens NendU, das essentiell für die Replikation der Coronaviren ist (Gorbalenya et al., 2006).

Die nachfolgenden offenen Leserahmen codieren für die Strukturproteine N (Nukleoprotein), M (Matrixprotein), E (Hüllprotein) und S (Oberflächenglykoprotein), die in allen Coronaviren stark konserviert sind (Marra et al, 2003; Rota et al, 2003). Die Proteine werden nicht direkt von dem Positivstrang-RNA-Genom synthetisiert, sondern zunächst in subgenomische RNA- Stränge übersetzt, von denen die Strukturproteine dann

abgelesen und synthetisiert werden. Am 3' nahen Ende des Genoms befinden sich weitere 7-8 teils überlappende offene Leserahmen, die für sogenannte akzessorische Proteine kodieren. Diese Proteine treten in verschiedener Anzahl und nur bei den Familien der Corona- und Toroviren auf. Sie werden ebenfalls wie die Strukturproteine zunächst in Subgenome übersetzt. Neuste Erkenntnisse besagen, dass diese akzessorischen Proteine zur Einteilung der Untergruppen der Coronaviren herangezogen und in Zusammenhang mit den verschiedenen Pathogenitätsfaktoren der Coronaviren gebracht werden können. Ebenfalls könnten sie für die spezifische Anpassung des Virus an ihren Wirt verantwortlich sein (Gorbalenya et al., 2006).



**Abb. 5: Genomstruktur des SARS Coronavirus**

Die RNA-Polymerase und die strukturellen Regionen werden zusammen mit den vorausgesagten Spaltprodukten in ORF1a und in ORF1b gezeigt. Auch die Position der nicht kodierenden Sequenz (*leader sequenz*) (L), das 3' Poly(A) Ende und die Stelle des Ribosomalen Leserahmens zwischen ORF1a und ORF1b werden angezeigt. Jedes Kästchen steht für ein Protein (NSP, Nichtstrukturprotein). Durch die Farben wird das Niveau der Aminosäureidentität mit dem gut homologen Protein anderer Coronaviren gezeigt. Die zusätzlichen SARS-CoV Gene sind weiß gekennzeichnet. Die mit IG beschrifteten Pfeile zeigen die Position der neun Transkriptionsregulatorischen Sequenzen (TRS), die für SARS CoV spezifisch sind (5'ACGAAC3'), an (Stadler et al., 2003).

ORF = open reading frame

### 1.3.3 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus des SARS CoV beginnt mit der Bindung des Spike-Proteins an den Wirtszellrezeptor Angiotensin konvertierendes Enzym 2 (ACE2) (Prabakaran et al., 2003; Wong et al., 2004). Es gibt einige Erkenntnisse die daraufhin deuten, dass es durch diese Bindung zu einer Konformationsänderung des Spike-Proteins mit daran anschließender endosomalen Proteolyse an einer oder mehreren Stellen in seine Untereinheiten kommt (Simmons et al., 2005). In eukaryotischen SARS CoV infizierten Zellen konnten die Spaltung des S-Protein gezeigt werden (Wu et al., 2004). Des Weiteren wurde gezeigt, dass durch Inhibition der Protease Cathepsin L der Virus Eintritt in die Zielzelle verhindert werden kann (Simmons et al., 2005; Huang et al. 2005). Dies deutet darauf hin dass Cathepsin L für die Spaltung des S-Protein verantwortlich ist. Ob gespaltenes Spike-Protein in SARS Coronaviruspartikel eingebaut wird und welchen Einfluss die Spaltung auf die Funktionen des Proteins hat wird kontrovers diskutiert.

Als nächster Schritt des Replikationszyklus ereignet sich die durch die S-Proteins vermittelte Membranfusion zwischen Virus und Wirtszelle (Petit et al., 2005). Die Fusion wird sowohl als pH unabhängig (Simmons et al., 2004) wie auch als pH vermittelter Vorgang (Yang et al., 2004) beschrieben. Endozytose des Viruspartikels wurde anfangs nicht beobachtet (Zhang et al., 2004). Nach neueren Untersuchungen kommt es beim Viruseintritt in die Wirtszelle zum Clathrin vermittelter Endozytose (Inoue et al., 2007).

Aus der Fusion von Virusmembran mit Wirtszellmembran resultiert die Freisetzung des viralen RNA Genoms ins Cytoplasma. Die Transkription und Translation der viralen Proteine sowie die Replikation der viralen RNA erfolgt im Cytoplasma. Es kommt als erstes zur Translation des Polyproteins ORF 1a /1b. Dieses wird durch autoproteolytische Aktivität einer im C-terminalen Bereich des Polyproteins enthaltenen chymotrypsinähnlichen Cysteinprotease in seine einzelnen Proteine

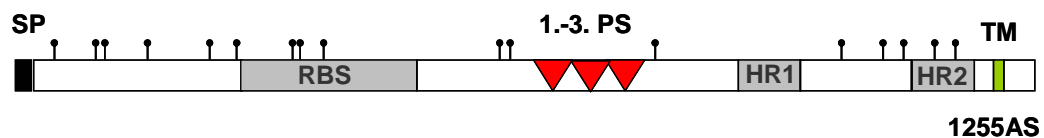


gespalten (Gorbalenya et al., 2006; Ziebuhr et al., 2000). Diese Proteine sind eine aktive RNA-abhängige RNA-Polymerase, eine Helikase mit Zink-bindender Domäne und ein Magnesium-abhängiges Enzym, namens NendU, das essentiell für die Replikation der Coronaviren ist (Gorbalenya et al., 2006).

Die RNA abhängige RNA-Polymerase schreibt nun das Plusstrang RNA Genom in einen Negativstrang um. Dieser dient als Matrize für die Synthese von neuen Plusstrang RNA Genomen sowie für die diskontinuierliche Transkription der subgenomischen mRNA Spezies für die Nichtstrukturproteine (NSP) und die Strukturproteine S, E, M, und N. Die subgenomischen mRNA's sind alle am 5' Ende identisch modifiziert mit einer Cap Gruppe und einer Leader Region (Ziebuhr et al., 2000). Von dem Satz geschachtelter (*nested*) mRNA Transkripte wird immer nur der am 5' Ende gelegene ORF translatiert (Thiel et al., 2001; Lai et al., 1997). Das N-Protein und die genomische Plusstrang RNA assemblieren im Cytoplasma zum helikalen Nukleokapsidkomplex. Von den verbleibenden Struktur Proteine S, E und M werden im Cytoplasma zunächst kurze Stücke translatiert und zum rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert. Dort werden die Strukturprotein in das Lumen des ER's synthetisiert. Durch Interaktion des Nukleokapsids mit dem M-Protein kommt es zur Knospung neuer Viruspartikel an intrazellulären Membranen zwischen dem ER und dem Golgi Apparat. Während des Transports durch das Golgi Netzwerk werden die Zuckerseitenketten des S-Proteins modifiziert (Stadler et al., 2003). Nicht bei allen, aber bei einigen Coronaviren erfolgt hier in Abhängigkeit der Spaltstellensequenz die Spaltung des S-Proteins in seine Untereinheiten. Das S-Protein von Maus Hepatitis Virus (Sturman und Holmes, 1985), Truthahn Coronavirus (Day et al., 1989) und Vogel Bronchitis Virus (Jackwood et al., 2001) werden proteolytisch durch Furin an einer multibasischen Spaltstelle gespalten. Nicht in die Viruspartikel eingebautes S-Protein wird über das Golgi Netzwerk an die Zelloberfläche transportiert. Als letztes werden die SARS CoV Partikel über Exosytose freigesetzt.

### 1.3.4 Das Spike-Protein

Das SARS CoV Spike-Protein S ist in der viralen Hüllmembran inseriert und spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Virus und seinem Rezeptor, der Virusaufnahme und dem zellulären Tropismus. Das S-Protein wird vom ORF2 (21492 bis 25259) kodiert und umfasst 3767 Basen, die für 1255 Aminosäuren kodieren, welche eine theoretische molekulare Masse von 139kDa haben (Stadler et al., 2003). Aus der Primärsequenz können zwei hydrophobe Domänen, ein N-terminales Signalpeptid, das für die Translokation in das raue endoplasmatische Retikulum verantwortlich ist und C-terminal die Transmembrandomäne zur Verankerung des Proteins, abgeleitet werden. Auf der Aminosäuresequenz des S-Proteins befinden sich 17 potentielle N-Glykosylierungsstellen der Bauart Asn-X-Ser/Thr ableitbar (Abb. 4). Es konnte gezeigt werden dass diese 17 N-Glykosylierungsstellen tatsächlich genutzt werden (Krokhin et al., 2003), somit hat die glykosylierte Form des S-Proteins eine theoretische molekulare Masse von 190kDa.



**Abb. 4: Schematischer Aufbau des Spike-Proteins**

Das Spike-Protein ist ein Protein mit 1225 Aminosäuren (AS). Es besitzt eine N-terminal gelegene Signalpeptidsequenz (SP). Von Aminosäure 303 bis 537 liegt die Rezeptor-Binde-Stelle (RBS) für Angiotensin-Converting Enzym 2 (ACE2). An Aminosäureposition 667 (1.PS), 761 (2.PS) und 796 (3.PS) befinden sich potentielle Spaltmotive für Endoproteasen. C-terminal enthält es eine Transmembrandomäne. Somit gehört das S-Protein zu den TypI-Membranproteinen. Des Weiteren hat das Protein 17 N-Glykosylierungsstellen (I) und zwei Heptad Repeats (HR1 und HR2) in der C-terminalen Hälfte.

An Aminosäureposition (AS) 796 besitzt es ein konserviertes Arginin. N-terminal wird dieses von einem Lysin flankiert. Beide Aminosäuren bilden ein dibasisches Spaltmotiv für zelluläre Proteasen. Andere Coronaviren,

wie das Vogel Bronchitis Virus und das Truthahn Coronavirus haben an dieser Aminosäureposition ein multibasisches Furinspaltmotiv der Bauart R-R-F/S-R-R (Jackwood et al., 2001). Das Maus-Hepatis-Virus wird an diese AS-Position an einem tetra- basischem Spaltmotiv in seine Untereinheiten gespalten (Sturman und Holmes, 1985). Des Weiteren befinden sich auf dem SARS-CoV S-Protein ein monobasisches Spaltmotiv an AS667 und ein basisches Tetrapeptid als Spaltmotiv für Furin an AS 761 (Bergeron et al., 2004).

Der zelluläre Rezeptor für SARS CoV wurde im Januar 2004 identifiziert. Es handelt sich dabei um das Angiotensin-Converting Enzym 2 (ACE2) (Hoffmann et al., 2005), eine Metallopeptidase auf der Oberfläche von eukaryontischen Zellen. Die S1 Untereinheit des Glykoproteins bindet an ACE2 (Li et al., 2005; Wong et al., 2004). Die Rezeptor-Binde-Stelle (RBS) liegt im Bereich der Aminosäuren 303-537 (Prabakaran et. al, 2004). Die S2-Untereinheit vermittelt den Eintritt des Virus in die Wirtszelle durch eine interne fusogene Region, die aus zwei sogenannten *heptad repeats* (HR1 und HR2) besteht (Keng et al., 2005; Beniac et al., 2006). Wie die Glykoproteine der anderen Coronaviren bildet das S-Protein Homo-Trimere (Song et al., 2004). Bei der Reifung des S-Protein spielen die Faltung, Disulfidbrücken, homooligomere Formation und N-Glykosylierung eine wichtige Rolle. All diese co- und posttranslationalen Prozesse sind fest mit dem intrazellulären Transport verbunden.

## **1.4 Aktivierung viraler Oberflächenproteine durch proteolytische Spaltung**

Der Eintritt membranumhüllter Viren in die Wirtszelle erfordert häufig eine proteolytische Spaltung der Oberflächenproteine der Viren in der Nähe einer Fusionsdomäne, welche die Fusion mit einer zellulären Membran ermöglicht (Nagai und Klenk, 1977). Ein Fusionsprotein wird zunächst als

inaktives Protein synthetisiert, danach in der Regel während der Reifung durch Proteasen aktiviert (Klenk und Garten, 1994). Diese Aktivierung kann aber alternativ auch beim Eintritt der Virionen in eine Zielzelle geschehen gezeigt für Influenza A Stamm WSN (Boykott et al., 1994). Durch diese Aktivierung kommt es in der Regel bei Orthomyxo-, Paramyxo-, und Retroviren zur Freisetzung eines aminoterminalen Fusionspeptids. Durch ein solches Fusionspeptid wird der erste Prozess der viralen und zellulären Membranverschmelzung eingeleitet. Es können prinzipiell zwei Wege beschritten werden. Einerseits kann es zu einer rezeptor-vermittelten Endozytose kommen, bei der die Verschmelzung der beiden Membranen erst im Endosomen statt findet, wie bei Influenzaviren gezeigt wurde (Klenk und Garten, 1994). Andererseits kann die Verschmelzung nach Rezeptor- oder Korezeptorbindung schon an der Plasmamembran geschehen wie dies für HIV-Virus oder Masernvirus nachgewiesen wurde (Dimitrov et al., 1997).

## **1.5 Endosomale/Lysosomale Proteasen**

Proteasen vermitteln die Hydrolyse von Peptidbindungen. Ihre Klassifikation in Aspartat-, Cystein-, Serin- oder Metallproteasen erfolgt anhand ihres katalytischen Zentrums (Barrett et al., 1994). Der Großteil der lysosomalen Proteasen sind Aspartat- oder Cysteinproteasen (Honey und Rudensky, 2003). Die meisten aber nicht alle der lysosomalen Cysteinproteasen sind Cathepsine (McGrath, 1999). Alle Cathepsine fungieren als Endopeptidasen. Für Cathepsin B ist zusätzlich beschrieben das es eine Exopeptidase-Aktivität besitzt (Bohley und Seglen, 1992). Die Aktivität der Cysteinproteasen ist pH abhängig. Ihr Optimum wird bei einem sauren pH Wert zwischen 5 und 6 beschrieben (Kirschke et al., 1987).

Unter den lysosomalen Cysteinproteasen, die nicht nur im Lysosomen, sondern in allen endosomalen Kompartimenten vorkommen und zum Teil auch sezerniert werden, lassen sich die ubiquitär exprimierte Cathepsine von gewebs- und zelltypspezifisch Cathepsinen unterscheiden. Zu den ubiquitär exprimierten Cysteinproteasen zählen Cathepsinen B, C, F, H, L, O und Z. Eine gewebspezifische Expression konnte bislang für Cathepsin K, S, W und V (auch L2 genannt) nachgewiesen werden (Rawlings und Barrett, 2000; Reinheckel et al., 2001; Turk et al., 2000). Gewebsspezifische Cathpsine spielen eine wichtige Rolle bei physiologischen und pathologischen Prozessen. Sie werden bei der Antigenprozessierung, der Aktivierung von Prohormonen, Wachstumsfaktoren und Toxinen benötigt (Authier et al., 1996; Bidere et al., 2003; Turk und Guncar. 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Cathepsine Einfluss auf virale Infektionen haben. Bei Infektionen mit Viren der Ordnung der Mononegavirales aus der Familie der Paramyxoviren, dem Hendra und Nipha Virus ist Cathepsin L an der proteolytischen Prozessierung des Fusions Proteins beteiligt (Pager et al, 2004; 2006). Für SARS CoV konnte gezeigt werden das Inhibition von Cathepsin L die Infektion der Wirtzelle verhindert (Simmons et al. 2005). Dies deutet daraufhin das Cathesin L bei der proteolytischen Aktivierung des SARS CoV S-Proteins ein wichtige Rolle spielt.

## 2 PROBLEMSTELLUNG

Das Spike-Protein (S) des akuten schweren Atemnotsyndroms Coronavirus (SARS-CoV), ein enger Verwandter der Gruppe 2 Coronaviren, ist ein Typ I Glykoprotein, das in hochmolekularer komplexverzuckerter Form (500kDa) als Trimeres S-Protein in der Hülle der Viren vorhanden ist. Die Ektodomaine des Proteins ist stark N-glykosyliert und ist essentiell für den Virus- Wirtszell- Kontakt. Das S-Protein ist 1255 Aminosäuren groß. Aus der Primärsequenz sind 17 potentielle N- Glykosylierungsstellen, ein Signalpeptid zur Translokation des Proteins in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und eine C-terminaler Membrananker deduzierbar. Einige S-Proteine (MHV, HCoV-OC43, AIBV and BCoV) aber nicht alle (TGV, FIPV, HCoV-229E) werden proteolytisch in zwei Untereinheiten, S1 und S2, an einem multibasischen Spaltmotiv von der zellulären Endoprotease Furin gespalten. Ob diese Spaltung essentiell für die Funktion des S-Proteins ist wird kontrovers diskutiert. Neueren Daten zufolge ist die Spaltung des S-Proteins für die Zell-Zell Fusion, aber nicht für die Fusion der Virushülle mit der Membran der Zielzelle essentiell.

Die Ziele dieser Doktorarbeit waren:

1. Die Herstellung von S-Protein spezifischen Antikörpern
2. Die Charakterisierung des S-Proteins
3. Die Untersuchung der proteolytischen Spaltungen des S-Proteins
4. Die Identifizierung der für die Spaltung verantwortlichen zellulären Proteasen

### 3 MATERIAL

#### 3.1 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aceton	Merck Eurolab, Darmstadt
Acrylamidlösung Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumacetat	Merck Eurolab, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck Eurolab, Darmstadt
Ampicillin (Natrium-Salz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aprotinin (Trasylo <sup>®</sup> )	Bayer, Leverkusen
APS (Ammoniumpersulfat)	Biorad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck Eurolab, Darmstadt
DAPI (4,6 <u>D</u> iamidino-2- <u>P</u> henyl <u>I</u> ndol)	Molecular Probes, Leiden
Didesoxynukleotide (dNTP)	Stratagene, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck Eurolab, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck Eurolab, Darmstadt
DOC (Desoxycholat, Na-Salz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure)	Merck Eurolab, Darmstadt
Essigsäure	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethanol	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Geneticin	Gibco BRL, Eggenstein
Glycerin	Merck Eurolab, Darmstadt
Glycin	Merck Eurolab, Darmstadt
Giemsa-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hyperfilm <sup>TM</sup>	GE Healthcare, München

---

Isopropanol	Riedel-de-Haën, Seelze
Jodacetamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck Eurolab, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth, Karlsruhe
L-Cysteine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lipofektamine <sup>TM</sup> 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Merck Eurolab, Darmstadt
Malonsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol (MeOH)	Riedel-de-Haën, Seelze
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Natriumacetat ( $\text{NaOAc}$ )	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Riedel-de-Haën, Seelze
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck Eurolab, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Serva, Heidelberg
Protein-A-Sepharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pyronin G	Sigma Aldrich, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Merck Eurolab, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck Eurolab, Darmstadt
Sulfo-NHS-SS-Biotin	Pierce, Rockford (USA)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Biorad, München
Trasylo <sup>®</sup> (Aprotinin)	Bayer, Leverkusen
Tris (Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Steinheim

Die in dieser Liste nicht aufgeführten Standardchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim) und Riedel-de-Haen (Seelze) bezogen.



### 3.2 Geräte

Agarosegelkammer	Harnischmacher Labor- und Kunststofftechnik, Kassel
Analysewaage excellence	Sartorius AG, Göttingen
Biofuge A	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Drehrad neoLab–Rotator	neoLab, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Göttingen
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
GeneAmp PCR System 2700	Applied Biosystems, Darmstadt
Heizblock	Heidolph, Schwabach
Incubator Shaker Model G25	New Brunswick, Nürtingen
Lichtmikroskop Wilovert	Will, Wetzlar
LS55 Spektrophotometer	Perkin Elmer, Rodgau- Jügesheim
MegaBACE 500 CE DNA Sequenzierer	Amersham Biosciences, München
Microfuge 20	Hettich, Tuttlingen
Microfuge 22 R	Hettich, Tuttlingen
Microcentrifuge II	Chiron Scientific, Inc., Sylvania USA
Mikrowelle	Samsung, Schwalbach
Odyssey Infrared Imaging System	LI–COR Biosciences, Bad Homburg
pH–Meter	Inolab, Weilheim
Photometer Gene Quant Pro	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala
Photosystem Bio Rad 2000	BioRad, München
Rotanta 460R	Kendro, Langenselbold

Rührer MR 3000	Heidolph, Schwabach
Electrophoresis Power Supply (EPS 301)	Amersham Biosciences, München
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallgerät Sonifier B–12	Branson, Danbury, USA
Ultrazentrifuge Optima™ L–100K	Beckman Coulter, Krefeld
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad GFL 1003	hilab.de, Düsseldorf
Zellzählkammer nach Neubauer	W. Schreck, Hofheim/ Ts.

### 3.3 Kits

E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I	Peqle, Erlangen
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
SuperSignal®	Pierce, Rockford, USA
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden

### 3.4 Verbrauchsmaterial

Cryoröhrchen	Corning, Niederlande
Deckgläser	Menzel–Gläser, Braunschweig
DNA–Längenstandard (1kb, 100bp)	NEB, Schwalbach

---

DNA–Probenpuffer (6x)	MBI Fermentas, St. Leon–Rot
Gewebekulturschalen 6cm	Greiner, Frickenhausen
Immersionsöl	Zeiss, Göttingen
Immobilion™-P (PVDF)	Millipore Corporation, Billerica USA
Protran® Nitrozellulosemembran, 0,45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger	Menzel–Gläser, Braunschweig
PageRuler Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon–Rot
Parafilm	Structure Probe Inc., München
PCR–Tubes	Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf
Pipetten (Plastik)	Greiner, Frickenhausen
Petrischale (35/10 mm)	Greiner, Frickenhausen
Petrischale (60x15 mm)	Greiner, Frickenhausen
Petrischale (94/16 mm)	Greiner, Frickenhausen
Polystyrolröhrchen TC–Tube	Greiner, Frickenhausen
PP–Test <i>tubes</i> (15 und 50ml)	Greiner, Frickenhausen
Prestained Protein Marker, Broad Range	NEB, Schwalbach
ProLong Gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen, Karlsruhe
Quarzküvetten	Hellma, Rabenau–Londorf
Rainbow™ molecular weight markers	GE Healthcare, München
Röntgenfilme Biomax MR	Kodak, Rochester, USA
<i>Save–Lock–Tubes</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Spritzen	Braun, Melsungen
TipOne–Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Ahrensburg
Whatman 3MM–Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel

---

Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> )	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> ) Costar®	Corning, Fischer Scientific GmbH, Schwerte–Geisecke
Zellkulturflaschen (162 cm <sup>2</sup> ) Costar®	Corning, Fischer Scientific GmbH, Schwerte–Geisecke
Zellkulturplatten mit 6, 12 oder 24 Vertiefungen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber	Sarstedt, Newton, USA
Zentrifugenröhrchen Ultra Clear (SW32/SW55)	Beckman Coulter, Krefeld

### 3.5 Enzyme

Cathepsin B	Calbiochem, San Diego, USA
Cathepsin L	Sigma-Aldrich, Steinheim
EndoH = Endoglykosidase H	New England Biolabs (NEB), Frankfurt a. M.
Pfu turbo- Polymerase	Stratagene Europe, Amsterdam
Peptid N-Glykosidase F (PNGaseF)	NEB, Frankfurt a. M.
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt a. M.
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
TPCK-Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Weitere hier verwendete Enzyme stammen aus den entsprechenden Kits und werden an dieser Stelle nicht gesondert aufgeführt.

### 3.6 Antikörper

#### 3.6.1 Kommerzielle Antikörper

Anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege	Pierce, Rockford, USA
HRP gekoppelt	
Anti-Mouse-IgG aus der Ziege	Pierce, Rockford, USA
HRP gekoppelt	
Anti-Kaninchen-IgG vom Schwein,	DAKO, Hamburg
HRP gekoppelt	
Anti-Kaninchen-IgG vom Schwein,	DAKO, Hamburg
FITC gekoppelt	

#### 3.6.2 SARS CoV Spike-Protein spezifische Antikörper

##### Polyklonale polyspezifische Kaninchen- Antiseren:

Kaninchen-Antiseren (11/03)	Institut für Virologie, Marburg
S1P	Institut für Virologie, Marburg
S2P	Institut für Virologie, Marburg
S6	Institut für Virologie, Marburg
S8L	Institut für Virologie, Marburg
S10	Institut für Virologie, Marburg
S1	Dr. Konrad Stadler, Sienna, Italien
S2	Dr. Konrad Stadler, Sienna, Italien
S1/S2	Dr. Konrad Stadler, Sienna, Italien
HR1	Dr. Konrad Stadler, Sienna, Italien
HR2	Dr. Konrad Stadler, Sienna, Italien

##### Monoklonale Maus- Antiskörper:

F26G6	Dr. Jody D. Berry, Winnipeg, Kanada
F26G8	Dr. Jody D. Berry, Winnipeg, Kanada

F26G18

Dr. Jody D. Berry, Winnipeg, Kanada

F26G19

Dr. Jody D. Berry, Winnipeg, Kanada

### 3.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Tib Molbiol Syntheselabor GmbH (Berlin) bezogen und sowohl für die Sequenzierungsreaktionen als auch für die Polymerasekettenreaktionen (4.1.1) eingesetzt. Die Nukleotidpositionen der eingesetzten Oligonukleotide beziehen sich auf die Sequenz des pcDNA3.1-Vektors, in den das kondonoptimierte SARS-Spike- Protein inseriert wurde. Dieses Konstrukt wurde von Dr. Deng aus China hergestellt (siehe Abb.3 in 2.8).

#### 3.7.1 Oligonukleotide für die Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz 5'–3'	Nukleotidpositionen
Seq1-h	CAGGACAGGAACACCAGG	2295
Seq1-r	GATCAGGTCCCTGGCGTT	2526
Seq2-h	CTGCTCCAGTACGGCAGCTTCTGCACC	3154
Seq2-r	GATCAGGTCCCTGGCGTTGATGTCGCC	3457
Seq3-h	ATCACACCTGGCACCAACGCCAGCAGC	2711
Seq3-r	TCACCACGTCGCAGTTGCCGCTCACG	4295
Seq4-h	GAGGATCTACAGCACCG	2818
Seq4-r	TCACCTCGGTGGTGATGC	3086
Seq5-h	GCCAAGACCAGCGTGGAC	3100
Seq5-r	GGTCGGGCAGGATCTGGC	3332

### 3.7.2 Mutagenese–Oligonukleotide

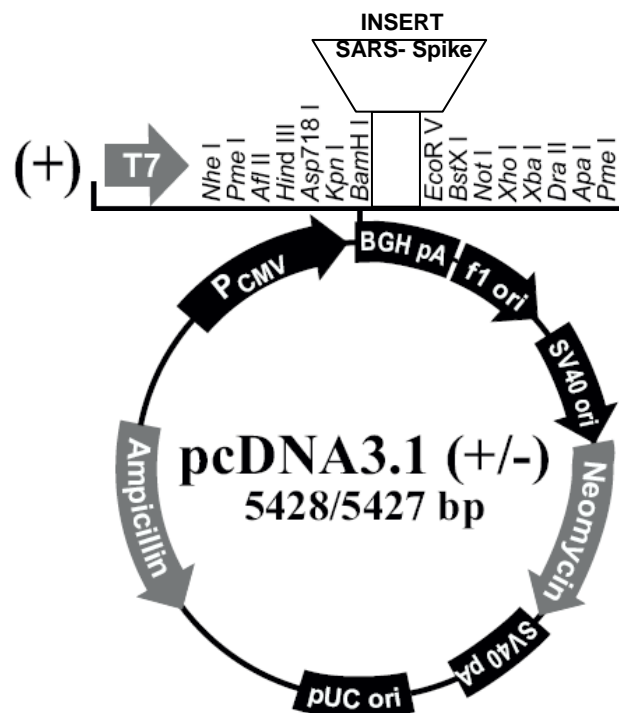
Bezeichnung	Sequenz 5'–3'	Nukleotid–positionen
Hin3347-KA	CTTCAGGGGGTCTGGG CCCGACCCCCTGAAGCCCACCC <u>GCG</u> AGG	3326
Rev3349-KA	AGCTTCATCGAG CTCGATGAAGCTCCT <u>CGC</u> GGTGGGCTT	3364
Hin3350-RA	CAGGGGGTCTGGG CCCGACCCCCTGAAGCCCACCAAG <u>GCG</u>	3326
Rev3352-RA	AGCTTCATCGAG CTCGATGAAGCT <u>CGC</u> CTTGGTGGGCTC	3364
HinAA3347	AGGGGGTCTGGG CCCGACCCCCTGAAGCCCACCC <u>GCGGCG</u>	3326
RevAA3352	AGCTTCATCGAG CTCGATGAAGCT <u>CGCCGC</u> GGTGGGCTT CAGGGGGTCTGGG	3364
HinRA2960	CCGTGAGCCTGCTG <u>GCG</u> AGCACCAGCC AGAAGAGCATCGTGGCC	2960
RevRA2962	GGCCACGATGCTCTTCTGGCTGGTGCT <u>CGC</u> CAGCAGGCTCACGG	2960
HinKA2975	CCGTGAGCCTGCTGAGGAGCACCAGCC AG <u>GCG</u> AGCATCGTGGCC	2975
RevKA2977	GGCCACGATGCT <u>CGC</u> CTGGCTGGTGCT CCTCAGCAGGCTCACGG	2975
HinAA2960	CCGTGAGCCTGCTG <u>GCG</u> AGCACCAGCC AG <u>GCG</u> AGCATCGTGGCC	2970
RevAA2960	GGCCACGATGCT <u>CGC</u> CTGGCTGGTGCT <u>CGC</u> CAGCAGGCTCACGG	2970

R451A/R454A	ACTACA ACTACAAGTA <b><u>CGCG</u></b> TACCT <b><u>GGC</u></b>	1961/1967
	GCACGGCAAGCTGAGGC	
R559A/R663A	GCACGGCAAGCT <b><u>GGCG</u></b> CCCCTTCGA <b><u>GGC</u></b>	1979/1988
	GGACATCAGCAAC	

Die fett unterstrichenen Nukleotide stellen den Substitutionsbereich dar.

### 3.8 Vektoren

**Vektor:** pcDNA3.1(+)-SARS-CoV-Gen des Spike Proteins



**Abb. 5:** Die Abbildung zeigt den Vektor pcDNA3.1(+) in den über die Restriktionsendonukleaseschnittstellen BamH I und EcoR V in der multiplen Klonierungsstelle das Gen des SARS-CoV- Spikeprotein inseriert wurde. Das Konstrukt weist somit eine Größe von 9248bp auf. Besonderheiten dieses Vektors sind eine Plasminogen-Aktivierungssequenz, sowie die Einfügung von 42 AS-Resten des cytoplasmatischen Endes des Sendai Virus. Weiterhin wurde eine Angleichung der verwendeten Kodons an übliche humane Kondons vorgenommen. Dieser Vektor wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. G. Herrler von der Technischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.



### 3.9 Prokaryotische Zellen

#### 3.9.1 Bakterien

*E. coli*, Stamm DH5 $\alpha$  NEB, SchwalbachF<sup>-</sup>O<sup>-</sup> *recA1 endA1 hsdR17* (*r<sub>K</sub><sup>-</sup>,m<sub>K</sub><sup>+</sup>*),  
 $\Delta(lacZYA-argF)U169\phi80d lacZ\Delta M15 supE44 thi-1$   
*gyrA96 relA1*; (Woodcock *et al.*, 1989)

#### 3.9.2 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur

<i>Luria Bertani</i> Medium (LB):	Pepton	10g
	Hefeextrakt	5g
	NaCl	10g
	<i>aqua bidest.</i>	ad 1l
LB-Agarplatten:	Pepton	10g
	Hefeextrakt	5g
	NaCl	10g
	Bacto-Agar	15g
	<i>aqua bidest.</i>	ad 1l
LB-Medium <sup>Amp</sup> / LB-Agar <sup>Amp</sup> :	LB-Medium/ LB-Agar + 0,1mg/l Ampicillin	

„Transformation Storage Solution Puffer“ (TSS-Puffer) zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien:

LB-Medium	850ml
Polyethylenglycol	100g
DMSO	50ml
MgCl <sub>2</sub>	10,17g
	ad 1l dH <sub>2</sub> O

Steril filtriert, mind. 4 Wochen bei 4°C haltbar

### 3.10 Antibiotika

Ampicillin	Sigma–Aldrich, Steinheim
Gentamicin (Refobacin)	Ratiopharm, Ulm
Penicillin G	Jenapharm, Jena

### 3.11 Eukaryotische Zellen

Die eukaryotischen Zellen befinden sich in der Stammhaltung des Instituts für Virologie, Marburg.

CHO-K1:	ATCC Nummer: CCL-61, Organismus: Chinesischer Hamster, ( <i>Cricetulus griseus</i> ), Gewebe: Ovarienepithelzellen
Vero:	ATCC Nummer: CCL-81, Organismus: <i>Cercopithecus aethiops</i> (Grüne Meerkatze), Gewebe: Niere, normal
MDCKII	ATCC Nummer: CCL-34, Organismus: Cockerspaniel ( <i>Canis familiars</i> ), Gewebe: Niere, normal

#### 3.11.1 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Dulbecco´s modified Eagle´s medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
DMEM ohne Cystein und Methionin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco BRL, Eggenstein
Geneticin (G418)	Gibco BRL, Eggenstein
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Lipofektamin 2000	Gibco BRL, Eggenstein

OptiMEM	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin 100x	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein

### 3.12 Viren

SARS-CoV:	Isolat Frankfurt (Stadler, et al. 2003)
VSVΔG–G (mit rekombinantem GFP)	Stamm Indiana Prof. Dr. G. Zimmer, TiHo Hannover, Institut für Virologie

### 3.13 Puffer für Zellkultur

PBS<sup>def</sup> (Phosphate Buffered Saline deficient): 8 g NaCl  
0,2 g KCl  
1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 1l dH<sub>2</sub>O

PBS<sup>++</sup> (Phosphate Buffered Saline): PBS<sup>def</sup> mit  
0,1 g MgCl<sub>2</sub>  
0,13 g CaCl<sub>2</sub>  
ad 1l dH<sub>2</sub>O

---

RIPA-Puffer (pH 7,5):	10% Triton X-100	100ml
	10% DOC	100ml
	10% SDS	10ml
	1M Tris/HCl (pH 7,5)	20ml
	0,5M EDTA (pH 8,0)	20ml
	1:20 Trasylol	50ml
	(Ampullen)	
	10mM Jodacetamid	925mg
		ad 1l dH <sub>2</sub> O

### 3.14 Puffer für Natriumdodecylsulfat-PAGE (SDS-PAGE)

10xSDS-Laufpuffer:	SDS	10g
	Tris/HCl	30g
	Glycin	144g
		ad 1l H <sub>2</sub> O

4xSDS-Probenpuffer (pH 6,8):	0,5M Tris/HCl (pH 6,8)	400ml
	SDS	40g
	Glycerin	400ml
	2% Bromphenolblau	10ml
	β-Mercaptoethanol	40ml
		ad 1l dH <sub>2</sub> O

### 3.15 Puffer für die Übertragung von in der SDS-Page aufgetrennten Proteinen auf Nitrozellulose

Anodenpuffer I (pH 9,0)	1M Tris/HCl (pH 9,0)	300ml
	Methanol	200ml
		ad 1l dH <sub>2</sub> O
Anodenpuffer II (pH 7,4)	1M Tris/HCl (pH 7,4)	25ml
	Methanol	200ml
		ad 1l dH <sub>2</sub> O
Kathodenpuffer (pH 9,0)	1M Tris/HCl (pH 9,0)	25ml
	Aminocaprinsäure	5,25g
	Methanol	200ml
		ad 1l dH <sub>2</sub> O

### 3.16 Puffer für Agarosegelelektrophorese

10xTBE-Puffer (pH 8,3):	Tris/HCl (pH 8,3)	108g
	Borsäure	55g
	0,5M EDTA (pH 8,0)	40ml
		ad 10ml dH <sub>2</sub> O
6xProbenpuffer:	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Saccharose	40% (w/v)

### 3.17 Puffer zur Plasmid-DNA-Isolierung (Fa. QIAGEN)

Puffer P1 (pH 8,0):	Tris/HCl	50mM
	EDTA	10mM
	RNAse	400µg/ml
Puffer P2:	Natriumhydroxid	200mM
	SDS	1% (w/v)
Puffer N3 (pH 4,8):	Kaliumacetat	255mM
Puffer QB (pH 7,0):	Natriumchlorid	1M
	MOPS	50mM
	Ethanol	15% (w/v)
Puffer QF (pH 8,0):	Natriumchlorid	1,2M
	MOPS	50mM
	Ethanol	15% (w/v)
TE-Puffer (pH 8,0)	Tris/HCl	10mM
	EDTA	1mM

### 3.18 Puffer für die Immunfluoreszenz

Blocking Puffer:	BSA	2% (w/v)
	Glycerol	5% (w/v)
	Tween	0,05% (w/v)
	NaN <sub>3</sub>	0,05% (w/v)
	gelöst in PBS <sup>def</sup>	

## **4 METHODEN**

Soweit nicht anders angegeben, entsprechen die in der Arbeit angewendeten molekularbiologischen Methoden den Standardverfahren nach Sambrook *et al.* (1989).

### **4.1 Zellbiologische Methoden**

#### **4.1.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen**

Alle verwendeten Zelllinien (3.11) wurden in Brutschränken mit einer konstanten Temperatur von 37°C und unter einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Als Kulturgefäße dienten 250ml Plastikflaschen mit einer Fläche von 75cm<sup>2</sup>.

#### **4.1.2 Passagieren von eukaryontischen Zellen**

Ablösen und Teilen adhärent gewachsener Zellen: Alle 3 bis 7 Tage wurden die konfluent gewachsenen Zellen passagiert. Das Medium wurde abgenommen und der Zellrasen mit 5 ml PBS<sub>def.</sub> gewaschen, so dass Zellreste und zweiwertige Kationen herausgewaschen wurden. Mit 5ml Trypsin/EDTA, was die interzellulären Proteinverbindungen löst, wurden die Zellen für etwa 2 bis 5min bei 37°C inkubiert und durch mehrfaches Aufziehen in eine Pipette vereinzelt. Überschüssiges Trypsin, daß die Zellen schädigt, wird durch Zugabe von 1x DMEM (3.12) mit 5-10% fötalem Kälberserum (FKS) inaktiviert. Die Zellen wurden in einem für jede Zellart spezifischen Verhältnis bezüglich der Fläche der Zellkulturflasche ausgesät.

#### **4.1.3 Einfrieren von eukaryontischen Zellen**

Für das längerfristige Aufbewahren von eukaryontischen Zellen werden diese in 10% DMSO bei -196°C über flüssigem Stickstoff gelagert. Der Zellrasen einer dichtbewachsenen 250ml Kulturflasche wurde mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden nach Trypsinbehandlung und Vereinzelung in 10ml 1x DMEM mit 10% FKS aufgenommen und bei 4°C für 5min mit 500x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde dann in 2ml 1x DMEM mit 10% FKS und 10% DMSO aufgenommen, und je 1ml in ein Einfrierröhrchen gegeben.

Um die Zellen kontinuierlich herunterzukühlen, wurden sie 24h in Isopropanol-gefüllte Gefrierbehälter bei -80°C gelagert, und daraufhin über flüssigen Stickstoff (-196°C) aufbewahrt.

#### **4.1.4 Auftauen von eukaryontischen Zellen**

Um gefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde das Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank in ein 37°C Wasserbad überführt. Sobald die Zellen aufgetaut sind, wurde der Inhalt in 10ml, ebenfalls auf 37°C vorgewärmtes, 1x DMEM mit 10% FKS gegeben und bei RT und 500x g für 5 min zentrifugiert. Mit diesem Waschschrift wurden der für Zellen schädlichen Anteile an DMSO entfernt. Das Zellsediment wurde in 1x DMEM mit 10% FKS resuspendiert, in eine 250ml Kulturflasche mit 20ml 1x DMEM mit 10% FKS gegeben und bei 37°C und unter 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.



#### **4.1.5 Lyse von eukaryontischen Zellen**

Die Zellen wurden auf Eis zweimal mit eiskalten PBS<sup>++</sup> gewaschen. Anschließend wurde 1ml RIPA-Puffer (3.14) auf die Zellen einer 60mm Kulturschale gegeben, diese 10min lysiert und das Zell-Lysat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Ultraschallbehandlung bei 40 Watt (30x 1 Sekunde) und 4°C in dem Sonifier 450 (Fa. Branson), die genomische DNA im Lysat fragmentiert. Unlösliche Aggregate wurden durch Zentrifugation für 30min bei 13000UpM und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert. Für eine immunologische Fällung wurden 300-500µl des Gesamtlysats eingesetzt.

In dem Fall des immunologischen Nachweis des exprimierten Proteins im Immunoblot, d.h. ohne vorangestellter Immunpräzipitation, wurden die Zellen direkt in 4 x Proben-Puffer (3.15) lysiert, Mercaptoethanol zugesetzt und mittels der SDS-PAGE (4.3.1) aufgetrennt.

#### **4.1.6 Transfektion eukaryontischer Zellen**

Um Fremdgene in eukaryotischen Zellen zur transienten Expression zu bringen, wurden die Zellen mit gereinigter Plasmid-DNA transfiziert. Für die Transfektion wird die Plasmid-DNA mit Hilfe von Lipiden komplexiert. Diese DNA-Lipidkomplexe können dann durch die Zellmembran hindurch in das Zytoplasma bzw. den Zellkern gelangen. In dieser Arbeit wurde das Transfektionsreagens Lipofektamine<sup>TM</sup> 2000 (Fa. Invitrogene) gemäß den Herstellerangaben benutzt.

Die Zellen wurden so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion auf Zellkulturschalen (oder auf Deckgläschen für die Immunfluoreszenz) eine Zelldichte von 80 bis 90% erreichen hatten.

Je nach Fläche und Zellkulturschale wurden folgende Ansätze verwendet:

	Platte mit 6 Vertiefungen	9cm Schale
Lsg. 1	1 ml 1x Optimem + 10 µl Lipofektamin 2000	1,5 ml 1x Optimem + 25 µl Lipofektamin 2000
Lsg. 2	1 ml 1x Optimem + 4µg Plasmid-DNA	1,5 ml 1x Optimem + 5µg Plasmid-DNA

Die Lösungen 1 und 2 wurden separat in Polystyrolröhrchen angesetzt und jeweils 2min inkubiert, anschließend zusammengegeben und für 25min bei RT zur Komplexbildung inkubiert.

Währenddessen wurde der Zellrasen einmal mit warmem PBS<sub>def.</sub>, sowie 1-2x mit warmem Optimem gewaschen. Danach wurde das Medium abgenommen und das Transfektionsmedium auf die Zellen gegeben.

Es folgte eine Inkubation von 6h im 37°C Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub>-Begasung danach wurde das Transfektionsmedium durch Kulturmedium (DMEM) ersetzt und die transfizierten Zellen für weitere 24h im Brutschrank inkubiert.

#### 4.1.7 Herstellung stabil exprimierender Zelllinien

Um eine stabil exprimierende Zelllinie zu erzeugen, macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass in wenigen Fällen eine Zelle nicht nur fremde Plasmid-DNA (3.8) aufnimmt, sondern diese auch in das zelluläre Genom integriert und somit das gewünschte Gen und einen Selektionsmarker stabil exprimiert.

CHO-Zellen wurden in 9cm Petrischalen ausgesäht und bis zu einer Konfluenz von 80% angezüchtet. Die Transfektion (4.1.6) erfolgte für 6 Stunden mit Lipofektamin 2000. Nachfolgend wurde das Transfektions-

medium abgenommen und Kulturmedium mit Geneticin (1µg/µl) zugesetzt. Nach 2-3 Tagen starben die ersten nicht Geneticin-resistenten Zellen ab. Das Selektionsmedium wurde während der Absterbephase täglich gewechselt. Nach ca. 8-10 Tagen hatten sich aus Einzelzellen wieder Zellklone entwickelt, die unter sterilen Bedingungen unter dem Mikroskop mit einer Pipette aufgenommen und in 24-Well-Zellkulturplatten mit frischem Medium überführt wurden. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten, als nächstes in 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen und schließlich in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Zur Expressionskontrolle wurden Proben jedes Klons in einer 6-Well-Zellkulturplatte angezüchtet und mittels SDS-PAGE (4.3.1) und anschließend Immunoblot (4.3.2) auf die korrekte Expression des Fremdgens kontrolliert. Positive Klone wurden weiter passagiert und in niedrigen Passagen über flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### **4.1.8 Herstellung von SARS Coronavirus infizierten Zelllysaten**

Die Virusinfektion wurde im Hochsicherheitslabor (BLS4) am Institut für Virologie in Marburg durchgeführt.

Zur Herstellung von infizierten Zelllysaten wurden in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen konfluent gewachsene Vero-Zellen einmal mit PBS<sub>def</sub> gewaschen und im nächsten Schritt mit SARS CoV der *multiplicity of infection* (MOI) von 1 infiziert. Die Zellen wurden mit 5ml einer entsprechenden Virusverdünnung in 1xDMEM ohne FCS inokuliert und für 1h bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen mit 1xDMEM, welchem 2% FCS zugesetzt wurde wieder im Brutschrank bei gleichen Bedingungen 24–48h inkubiert. Danach zeigten die Zellen einen deutlichen zytopathischen Effekt

(CPE). Nun wurden die Zellen in 1% SDS lysiert und bei 100°C für 10 min aufgeköcht.

#### **4.1.9 Virusreinigung**

Für die Virusreinigung wurden fünf konfluent mit Vero Zellen bewachsene 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen wie in 4.1.8 beschrieben mit SARS Coronavirus infiziert und für 48h im Brutschrank inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden abgenommen und durch eine niedertourige Zentrifugation (10 min, 4000 rpm) von Zelltrümmern befreit. Danach wurde das SARS Coronavirus mittels Ultrazentrifugationen (UZ) aufgereinigt. In der UZ wurde das Virus in einem SW28 Ausschwingrotor sedimentiert. Hierfür wurde in den SW28 Röhrchen ein 20%iges Rohrzuckerkissen (5ml) mit dem vorbehandelten Zellkulturüberständen überschichtet und bei 28000 rpm und 4°C für 2h zentrifugiert. Das Virus wird in PBS<sup>++</sup> aufgenommen und bei -80°C eingefroren.

#### **4.1.10 Fusionsassay**

Zellen die das SARS COV S-Protein auf ihrer Oberfläche exprimieren, können mit ihren Nachbarzellen fusionieren, wenn diese den Rezeptor Angiotensin Converting Enzym 2 (ACE2) tragen. Diese Fusion führt zur Bildung von Riesenzellen, sogenannten Synzytien.

Es wurde die Fusionsaktivität von stabil exprimierenden Zellen mit und ohne inhibitorische Peptide getestet. Hierfür wurden die Zellen auf Platten mit 6 Vertiefungen bis zu einer Zelldichte von 90-100% kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und mit Methanol für 10 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen für mindestens 30 min mit einer 1:20 in H<sub>2</sub>O verdünnten Giemsa-Lösung gefärbt. Die Zellen

wurden mit einem Lichtmikroskop betrachtet und zur Dokumentation und Auswertung fotografiert. Die Auswertung erfolgt durch zählen von Polykaryen größer zwei Zellkerne.

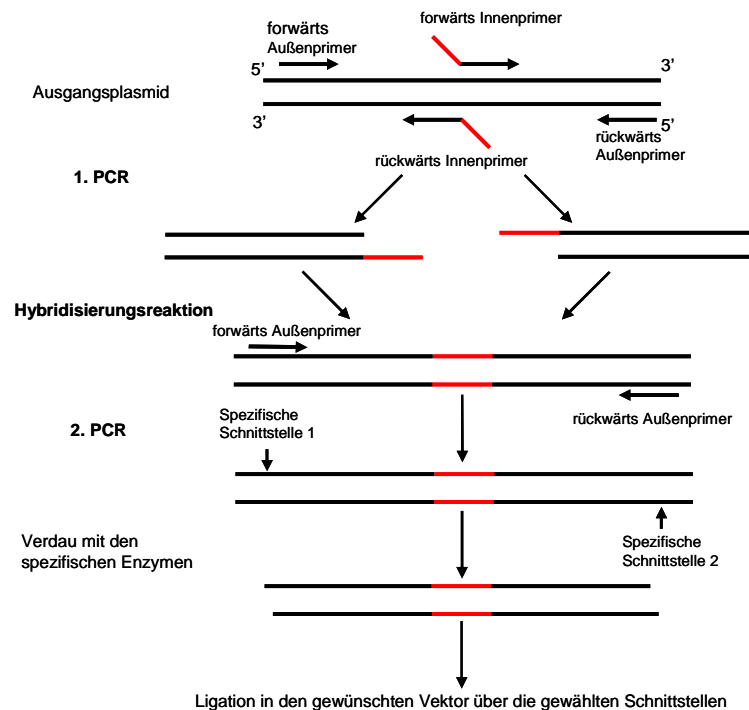
## **4.2 Molekularbiologische Methoden**

### **4.2.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR= Polymerase chain reaction) ermöglicht die Amplifikation von DNA-Fragmenten, die sich zwischen zwei mit der Matrizen-DNA antiparallel hybridisierenden Oligonukleotiden befindet (Mullis et al., 1987).

### **4.2.2 Rekombinante PCR (nach Higuchi et al. 1988)**

Die rekombinante PCR ist eine Methode, mit der Deletionen, Insertionen sowie Substitutionen in Gene einführen oder Abschnitte verschiedener Gene miteinander fusionieren kann. Zunächst wurden durch eine PCR-Reaktion (4.2.1) zwei überlappende Fragmente synthetisiert, bei dem das 5'-Ende des einen Fragments komplementär zum 3'-Ende des anderen Fragmentes war. In der sich anschließenden Hybridisierungs- und Auffüllreaktion wurden die beiden Einzelstränge miteinander fusioniert und aufgefüllt und durch eine zweite PCR- Reaktion amplifiziert. Das Fusionsprodukt wurde im folgenden Schritt durch Restriktionsendonukleasen geschnitten und in den entsprechenden Genabschnitt ligiert.



### PCR-Ansatz

Für die Amplifikation wurde die „*Pfu turbo* Polymerase“ und der zugehörige 10x-Reaktionspuffer verwendet und der gewünschte DNA-Abschnitt in folgendem Reaktionsansatz in 200µl-PCR- Reaktionsgefäßen im „Thermozycler“ (GeneAmp PCR System 2700) vervielfältigt.

Reaktionsansatz:	Komponenten	Volumen
	10x Reaktionspuffer	5µl
	dNTP-Mix S (10mM)	1µl
	Oligonukleotid 1(hin)	100ng
	Oligonukleotid 2(rück)	100ng
	Matrizen-DNA	100ng
	<i>Pfu turbo</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)	1µl
	<i>aqua bidest.</i>	Ad 50µl

Anzahl Zyklen	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95°C	2 Minuten
30	Denaturierung	95°C	30 Sekunden
	Hybridisierung	65°C	30 Sekunden
	Polymerisation	72°C	1 Minute
1	Polymerisation	72°C	10 Minuten
		4°C	∞

Die Temperatur der Hybridisierung richtet sich nach den verwendeten Oligonukleotiden.

Das PCR-Amplifikat wurde zur Kontrolle durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert (4.2.4).

#### 4.2.3 Mutagenese von DNA mittels Quickchange Multi

Mit dieser Methode können gleichzeitig bis zu fünf verschiedene Mutationen gesetzt werden. Durchgeführt wird die Reaktion in drei Schritten. Der erste Schritt beinhaltet die Synthese der DNA. Für die Synthese wird der folgende Reaktionsansatz im „Thermocycler“ (GeneAmp PCR System 2400) vervielfältigt.

Reaktionsansatz:	Komponenten	Menge
	Vektor	100ng
	10x QuickChange® Multi	2,5µl
	Reaktionspuffer	
	QuickSolution	0,75µl
	Mutagenese Primer	100ng
	dNTP mix	1µl
	QuickChange® Multi	1µl
	PfuTurbo®	
	<i>aqua bidest.</i>	ad 25µl

Anzahl Zyklen	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95°C	1 Minuten
30	Denaturierung	95°C	1 Minute
	Hybridisierung	55°C	1 Minute
	Polymerisation	65°C	2 Minuten/ kb des Plasmids

Nach der PCR wird der Reaktionsansatz für zwei Minuten auf Eis gestellt und so auf 37°C abgekühlt. Der zweite Schritt beinhaltet nun den Verdau mit 1µl der Endonuklease DpnI. Diese ist spezifisch für den Abbau der parentalen DNA, welche aus *E. coli* Zellen isoliert und somit in den meisten Fällen dam methyliert ist.

Im dritten und letzten Schritt des Protokolls wird der Reaktionsansatz mit der einzelsträngigen DNA in XL10Gold® ultracompetente Zellen transformiert. In diesen Zellen wird die zirkuläre Einzelstrang DNA in doppelsträngige Plasmid DNA konvertiert.

#### 4.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

Die Agarosegel-Elektrophorese eignet sich zur Auftrennung von PCR-Produkten, zur Kontrolle von mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen Plasmiden, zur Bestimmung der DNA-Fragmentlänge und zur Überprüfung der Reinheit von DNA, indem die DNA-Fragmente im Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die DNA-Moleküle sind im verwendeten Puffer aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen und wandern daher im elektrischen Feld zur Anode. Die Laufgeschwindigkeit der Nukleinsäure im Agarosegel nimmt mit zunehmender Anzahl von Basenpaaren (bp) ab. Die Trennleistung der Agarosegele liegt zwischen wenigen hundert bis zu mehreren tausend Basenpaaren. Abhängig von



der Größe der zu trennenden Fragmente kann die Agarosekonzentration zwischen 0,5 und 2% variieren. Da das dem Gel zugesetzte Ethidiumbromid bzw. das im anschließenden Färbegrad enthaltene Ethidiumbromid in doppelsträngige DNA interkaliert, lassen sich die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar machen. Die Fragmentlängen der Banden und deren DNA-Menge kann anhand der mitgeführten Längenstandards (Marker) abgeschätzt werden.

In dieser Arbeit wurde 1% Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht und in den Gelschlitten mit entsprechendem Kamm gegossen, der die Probetaschen frei von Agarose hält. Nach dem Erkalten der Agarose wurde der Gelschlitten in die Laufkammer gestellt und diese mit 1x TAE-Puffer gefüllt, bis das Agarosegel mit dem Laufpuffer ca. 1cm bedeckt war und der Kamm gezogen. Vor dem Auftragen der Proben in die Taschen wurden diese mit 6x konzentriertem Auftragspuffer versetzt, der ein Absinken der Proben in die Taschen sicherstellte. Für analytische Gele wurden 5µl DNA-Probe mit 1µl 6 x Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Als Marker wurde der entsprechende Größenstandard verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel wurde unter einer Spannung von 5V/cm, bezogen auf den Abstand der Elektroden, vorgenommen. Die Laufzeit betrug, je nach Fragmentgröße, 30 bis 60min. Im Anschluss daran wurde die DNA mittels Ethidiumbromidbad (10µg/ml in 1xTAE-Puffer) für 20min auf dem Schüttler gefärbt. Die Betrachtung und Dokumentation der DNA-Auftrennung wurde unter langwelligem UV-Licht bei einer Wellenlänge von 360nm durchgeführt.

#### **4.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel**

Zur Extraktion der DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden die DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht mit dem Skalpell ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Fa.

Qiagen, Hilden) (3.3) aufgereinigt. Hierbei ist zu beachten, dass kurzwelliges UV-Licht DNA schädigt (z.B. durch Bildung von Purindimeren). Daher wurde zum Ausschneiden langwelliges UV-Licht (320nm) verwendet und die Expositionszeit möglichst kurz gehalten. Im Anschluss daran wurde die Gelextraktion nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass DNA nach dem Aufschmelzen der Agarose unter hohen Salzkonzentrationen und einem pH von über 7,5 an eine Silikagel-Membran bindet. Verunreinigungen wie Salze und Enzyme sowie Oligonukleotide mit einer Größe von bis zu 100bp binden unter diesen Bedingungen nicht und werden durch Waschschrte mit ethanolhaltigem Waschpuffer entfernt. Abschließend wird die DNA mit 30µl Wasser eluiert.

#### **4.2.6 Hybridisierungs- und Auffüllreaktion**

Die Produkte aus der ersten PCR werden nach der Aufreinigung in einer zweiten PCR hybridisiert, aufgefüllt und schließlich das Fusionsprodukt amplifiziert. Zunächst werden dazu die beiden komplementären Enden durch Erhitzen denaturiert, beim darauf folgenden Abkühlen hybridisieren die komplementären Enden miteinander und schließlich wird der jeweilige fehlende Teil des Gegenstranges aufgefüllt und amplifiziert.

Dazu wurden ca. 10-50ng der gereinigten DNA-Fragmente mit den passenden überlappenden Enden aus der ersten PCR zum zweiten PCR-Reaktionsansatz gegeben, welcher die beiden äußeren Primer enthält (3.7.2).

Das gewonnene Fusionsprodukt wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit von störenden Nukleotiden, Primern und Enzymen gereinigt und im Agarosegel auf Größe und Reinheit überprüft und anschließend einem Restriktionsendonukleaseverdau unterzogen.

#### 4.2.7 Analytischer Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die DNA an spezifischen Nukleotidsequenzen schneiden. Diese Erkennungssequenzen liegen häufig in Form von gegenläufigen identischen Sequenzen vor, auch Palindrom genannt. Durch die Behandlung mit Restriktionsendonukleasen lässt sich doppelsträngige DNA in Fragmente mit festgelegten 3'-und 5'-Enden und bekannter Größe zerlegen.

Diese Methode wird daher für die Herstellung vektorkompatibler PCR-Fragmentenden, Klonierungen und den Endonukleaseverdau zur Kontrolle von Plasmiden mit diversen Endonukleasen sowie für die Linearisierung von Expressionsvektoren verwandt. Der Verdau mit Restriktionsendonukleasen wurde im Gesamtvolumen von 10µl angesetzt, für eine bis zwei Stunden unter restriktionsenzymspezifischer Temperatur und Pufferbedingungen im Wasserbad inkubiert und danach in einer Agarosegel-Elektrophorese (4.2.4) analysiert.

Reaktionsansatz:	Komponenten	Volumen
	ds DNA	10-50µg
	10xRestriktionspuffer	1µl
	Restriktionsendonuklease	1µl
	Aqua bidest.	ad 10µl

Für einen Endonukleaseverdau von DNA mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen ist auf den Einsatz eines für beide Endonukleasen optimalen Restriktionspuffers zu achten.

#### 4.2.8      **Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

DNA-Fragmente aus PCR- oder Restriktionsansätzen enthalten meistens neben der linearisierten Vektor-DNA noch Enzyme, Nukleotide und ein ungeeignetes Puffermilieu. Bevor diese DNA-Fragmente für eine Ligation eingesetzt werden können, muss die darin enthaltene DNA aufgereinigt werden. Dies erfolgte mittels „QIAquick PCR Purification Kit“ (Fa. Qiagen, Hilden) (3.3). Das hierbei zugrunde liegende Prinzip bildet die reversible Bindung der DNA an eine Silikamatrix bei hohen Salzkonzentrationen und Elution bei niedrigen Salzkonzentrationen bzw. bei *aqua bidest.* Alle Zentrifugationen wurden in einer Mikro 22 R Zentrifuge bei 13.000 Upm durchgeführt. Zum Probenansatz wurde das 5-fache Volumen Puffer PB zugegeben und der Ansatz auf die QIAquick Silikamembransäule gegeben. Die Säule wurde für 1min zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Silikamembran mit 750µl PE Puffer gewaschen. Pufferreste wurden vollständig entfernt durch eine weitere Zentrifugation. Die Membran wurde mit 30µl *aqua bidest.* überschichtet und zum lösen der DNA 2min bei RT inkubiert und schließlich durch Zentrifugation von der Silikamembran eluiert.

Der Hersteller macht zu den Puffern und Säulen keine Angaben.

#### 4.2.9      **Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase**

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die kovalente Verknüpfung von 3'-Hydroxylgruppen mit freien 5'-Phosphatgruppen zu Phosphodiesterbindungen. Daher eignet sie sich für die Ligation von Fremdgenen in Vektoren, wenn diese kompatible Enden in der korrekten Orientierung besitzen. Dabei kann es sich sowohl um überhängende als auch um glatte Enden handeln.

Die DNA-Konzentration von Restriktionsenzym-behandeltem Plasmid bzw. Insert wurde nach Auftrennung im Agarosegel und der Ethidiumbromidfärbung (4.2.4) anhand der Bandenintensität im Vergleich zum verwendeten DNA-Längenstandard bestimmt.

Eine hohe Ligationseffizienz wurde dadurch gewährleistet, dass das molare Verhältnis von Vektor und dem zu klonierenden DNA-Fragment 1:3 bis 1:5 betrug. Die Effizienz der Verknüpfungsreaktion wird durch ein kleines Reaktionsvolumen und eine hohe Konzentration an T4-Ligase gefördert.

Reaktionsansatz:	Komponenten	Volumen
	Vektor	2µl
	DNA-Insert	8µl
	10 x Ligationspuffer (0,5 M Tris/HCl, pH 7,6 0,1 M MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT, 10 mM ATP)	1,5µl
	T4-DNA-Ligase (5U/µl)	1µl
	Aqua bidest.	ad 15µl

Die Ligationsreaktion wurde für 16 Stunden im 16°C-Wasserbad oder über 2 Tage bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Für die folgende Transformation (4.2.10) in kompetente Bakterien wurde der gesamte Ligationsansatz verwendet.

#### 4.2.10 Transformation

Verschiedene Bakterienstämme wie z.B. *E.coli* DH5α können durch die Behandlung mit geeigneten Chemikalien wie TSS-Puffer bestehend aus 10% PEG, DMSO und Magnesiumchlorid (Chung et al., 1998) oder durch

Glycerin und Calciumchlorid zur Aufnahme von DNA-Molekülen befähigt werden. Durch einen Hitzeschock oder einen elektrischen Impuls kann dann die Effizienz der DNA-Aufnahme in diese Bakterien erhöht werden. Erfolgreich transformierte Bakterien können über eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz selektioniert werden.

#### **4.2.10.1 Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterien mittels Calciumchlorid**

Durch die Behandlung mit Calciumchlorid kann in *E. coli* DH5 $\alpha$  Transformationskompetenz induziert werden. Dazu wurden zu 100ml LB-Medium 1ml einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  –Zellen gegeben und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 herangezogen. Darauf folgte eine Inkubation von 10min auf Eis bevor die Zellen für 10min bei 4000UpM und 4°C zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde in 50ml steriler 50mM Calciumchloridlösung resuspendiert und für 30min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10min, 4000UpM und 4°C wurden die Zellen in 3,3ml eisgekühlter 50mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und erneut für 30min auf Eis inkubiert. Diese Suspension wurde mit Glycerin in einer Endkonzentration von 15% versetzt.

Die Zellen wurden abschließend zu je 100 $\mu$ l aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **4.2.10.2 Transformation Hitzeschock- kompetenter Bakterien mit Plasmid- DNA**

Der komplette Ligationsansatz bzw. 0,2 $\mu$ g DNA wurden mit 100 $\mu$ l Calciumchlorid-kompetenten Zellen zunächst für 30min auf Eis inkubiert

für 2min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und in weiteren Verlauf für 2min auf Eis inkubiert. Als nächstes wurden 500µl vorgewärmtes LB-Medium zu den Zellen gegeben und die Suspension zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz für Ampicillin 1h bei 37°C auf dem Schüttler (200UpM) inkubiert. Es wurden jeweils 60µl (1/10) und das Restvolumen (9/10) auf LB-Agarplatten, die Ampicillin (100µg/ml) enthielten, ausplattiert.

Unter diesen Selektionsbedingungen wachsen während der 12-16stündigen Inkubation bei 37°C nur transformierte Bakterienklone heran.

Als Kontrolle dienen

- a. kompetente Zellen ohne Vektor
- b. kompetente Zellen mit Expressionsvektor ohne Insert.

Die bewachsenen Platten wurden bis zu weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

#### **4.2.11 Kultivierung von Bakterien**

Alle benötigten Kulturen von *Escherichia coli* wurden in LB-Medium bzw. auf LB-Agarplatten bei 37°C angezogen.

#### **4.2.12 Herstellung einer Übernachtskultur**

Hierfür wurden 5ml LB-Medium mit einer steril gepickten *E. coli*- Kolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (200 UpM) mit 100µg/ml Ampicillin inkubiert.

#### **4.2.13 Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde die Methode der alkalischen Lyse der Bakterien angewendet (Birnboim et al., 1979). Die Plasmid-DNA wurde an eine Silikamatrix (bei kleinen Präparationen) oder Anionenaustauschersäulen (für Präparationen im großen Maßstab) in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen adsorbiert (Vogelstein et al., 1979). Die DNA wurde in Wasser eluiert.

##### **4.2.13.1 Plasmid-DNA-Isolierung im kleinen Maßstab**

Zur Präparation von bis zu 20µg Plasmid-DNA wurde das „E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I“ (3.3) der Fa. PEQLAB, Erlangen, samt der mitgelieferten Puffer verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Zentrifugationen für 1min bei 13.000UpM und RT in einer Mikrozentrifuge (3.2) durchgeführt.

Zur Anzucht einer Kultur wurden 5 ml LB-Medium (100µg/ml Ampicillin) mit einer transformierten Bakterienkultur beimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. 1,5ml dieser Übernachtskultur wurden für 5min bei RT pelletiert, der Überstand verworfen und das Bakteriensediment zur Zellwandlyse und zur enzymatischen Degradierung zellulärer RNA in 250µl eiskaltem Lyse-Puffer (Lösung I/RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 250µl des zweiten Lyse-Puffers (Lösung II) wurde das Gefäß mehrmals invertiert und 5min bei RT inkubiert bis ein klares Lysat entstand. Durch Zugabe von 350µl der Lösung III wurde das Lysat neutralisiert, die Plasmid-DNA renaturiert und die genomische DNA sowie Proteine gefällt. Die unlöslichen Bestandteile wurden anschließend durch eine 10-minütige Zentrifugation abgetrennt.

800µl des klaren, plasmidhaltigen Überstandes wurden auf eine HiBind®-Miniprep-Zentrifugensäule überführt, so dass die Plasmid-DNA während



der darauf folgenden Zentrifugation an die Silikamatrix binden konnte. Die Säule wurde zur Beseitigung von Kontaminationen und Enzyminhibitoren einmal mit 500µl HB- und danach einmal mit 750µl DNA-Waschpuffer gewaschen. Es folgte eine einmalige Leerzentrifugation um alle Pufferreste zu entfernen. Die Plasmid-DNA wurde in 30µl *Aqua bidest.* eluiert.

Der Hersteller macht weder Angaben zur Zusammensetzung der verwendeten Puffer sowie den HiBind®- Miniprep- Zentrifugensäulen, noch zu weiterführender Literatur.

#### **4.2.13.2 Plasmid-DNA-Isolierung im großen Maßstab**

Zur Gewinnung von bis zu 500µg Plasmid-DNA wurde das „HiSpeed Plasmid Maxi Kit“ (3.3) der Firma Qiagen, Hilden samt den mitgelieferten Puffern verwendet.

Es wurden 150ml LB-Medium (100µg/ml Ampicillin) mit einer Übernachtskultur (4.2.12) transformierter Bakterien 1:1000 angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde für 10min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 4.600 UpM (Rotanta 460 R) für 15 Minuten pelletiert und das Bakterienpellet in 10ml kaltem Puffer P1 (mit RNase A) resuspendiert. Durch Zugabe von 10ml Puffer P2 beginnt die alkalische Lyse der Bakterienkultur, die nach fünfminütiger Inkubation durch Zugabe von 10ml Puffer P3 gestoppt und neutralisiert wurde. Der Ansatz wurde daraufhin in eine QIAFilter-Kartusche überführt. Während der zehnminütigen Inkubation bei RT bilden sich an der Oberfläche unlösliche Komplexe bestehend aus genomischer DNA, Proteinen und Zelltrümmern.

#### *Säulenchromatographie (Anionenaustauschersäulen):*

Das Lysat wurde im nächsten Schritt durch den Filtereinsatz gedrückt und auf eine zuvor mit 10ml Puffer QBT equilibrierte QIASäule gegeben, um die DNA an das Säulenmaterial zu binden. Die Säule wurde mit 60ml Puffer QC gewaschen und die DNA danach mit 15ml Puffer QF eluiert.

#### *DNA-Fällung:*

Die gelöste DNA wurde mit dem 0,7-fachen Volumen (10,5ml) Isopropanol gemischt und 5min bei RT inkubiert. Das Präzipitat wurde durch das QIAprecipitator Modul gefiltert, wobei die DNA an die Matrix des Moduls binden konnte. Nachdem die DNA mit 2ml 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet wurde, wurde sie mit 800-1000µl *aqua bidest.* eluiert und bei -20°C gelagert.

#### **4.2.14 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen**

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA wird die Beziehung des Lambert Beer'schen Gesetzes angewendet. Die DNA-Konzentration wurde anhand der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen einen Leerwert (*aqua bidest.*) gemessen. Es wurde eine Quarzküvette mit 500µl Füllvolumen und einer Schichtdicke von einem Zentimeter verwendet. Um den linearen Messbereich von 0,01-0,8 einzuhalten wurde die zu bestimmende DNA-Lösung 1:100 mit *aqua bidest* verdünnt.

Die Reinheit der DNA wurde durch eine weitere photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 280nm bestimmt, da Proteine bei dieser Wellenlänge ultraviolettes Licht absorbieren. Das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$

sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Falls nicht, sollte ein weiterer Reinigungsschritt angeschlossen werden.

Für die Konzentrationsbestimmung gilt folgende Beziehung:

OD<sub>260</sub> = 1 entspricht ~50µg doppelsträngiger DNA pro ml, oder

OD<sub>260</sub> = 1 entspricht ~40µg einzelsträngiger DNA pro ml, oder

OD<sub>260</sub> = 1 entspricht ~20µg Oligonukleotide pro ml

#### **4.2.15 Sequenzierung von DNA nach Sanger et al. (1977)**

Die Methode basiert auf der enzymatischen Synthese von DNA und Kettenabbruch durch Didesoxynukleotide (Sanger et al., 1977). Dabei wird eine PCR-Reaktion mit nur einem Primer durchgeführt. Im Reaktionsansatz befinden sich neben den vier Desoxynukleotiden (dNTPs) zu einem geringen Anteil auch mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs), wobei jedes der verschiedenen ddNTPs mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Während der DNA-Synthese kommt es durch den Einbau der ddNTPs zu statistisch verteilten Kettenabbrüchen, da die ddNTPs nicht die notwendige 3'OH-Gruppe für die 5'-3'-Phosphodiesterbindung besitzen. Somit entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die alle das gleiche 5'-Ende besitzen und deren letztes Nukleotid am 3'-Ende jeweils ein Fluoreszenzmarkiertes ddNTP enthält. Dadurch werden die DNA-Fragmente abhängig von dem Nukleotid, bei dem die Synthese abgebrochen ist, mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Nach der Aufreinigung werden die DNA-Fragmente elektrophoretisch der Länge nach aufgetrennt, wobei ein Laser die Fluoreszenz des jeweiligen Fragments detektiert. Die Auswertung der Sequenzierreaktion erfolgt durch eine spezielle Software.

Die Proben wurden mit dem MegaBACE 500 CE DNA Sequenzierer (3.2) sequenziert und mittels Chromas- Software ausgewertet.

### **4.3 Biochemische- und Immunologische-Methoden**

#### **4.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Durch die Natrium- Dodecylsulfat (SDS)- PAGE lassen sich Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgrund ihrer Massenunterschiede in einem diskontinuierlichen hochauflösenden Polyacrylamid Puffersystem trennen (Laemmli, 1970). Die Proteine werden mit einem SDS-haltigen Probenpuffer versetzt, wobei das Detergenz fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört. Die SDS-Anionen binden an die Proteine, so dass diese eine negative Gesamtladung erhalten, welche bei Protein > 60.000 MW ungefähr proportional zur Masse der Proteine ist. Zur Reduktion von möglichen Disulfidbrücken wird  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt.

Für die elektrophoretische Auftrennung werden chemisch inerte Polyacrylamid- Gele verwendet. Der Vernetzungsgrad wird durch das Verhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid nach der Polymerisation bestimmt. Im Gel werden die aufgetrennten Proteine durch Coomassie- oder Silberfärbung detektiert, bzw. radioaktivmarkierte Proteine durch Auflegen eines Röntgenfilms auf das fixierte und getrocknete Gel mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Proteine können des Weiteren durch „Elektroblotting“ (4.3.2) auf eine geeignete Membran transferiert und mittels Antikörper immunchemisch nachgewiesen werden.

Zunächst wurden die Glasplatten der Gelapparatur mit Ethanol gereinigt und mit Abstandshalter (Spacer) in die Gießapparatur eingebaut. In dieser Arbeit wurden ausschließlich 10%ige Polyacrylamidgele (Trenngel 6ml) verwendet, die mit einem 3,75%igem Polyacrylamidgel überschichtet

wurden, das als Sammelgel diente. Ein Kamm, der luftblasenfrei in das noch nicht polymerisierte Sammelgel eingesetzt wurde, formte dabei die Probentaschen.

Folgende Chemikalien wurden für das Trenn- und Sammelgel verwendet:

	Trenngel: 8%	Trenngel: 10%	Sammelgel: 3,75%
Acrylamidlösung Gel 30	2,65ml	3,3ml	1,7µl
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5ml	2,5ml	_____
1 M Tris/HCl pH 6,8	_____	_____	3,4ml
10% (w/v) SDS	100µl	100µl	133µl
<i>aqua bidest.</i>	4,65ml	4,0ml	8,2ml
Pyronin G	_____	_____	53µl
10% (w/v) APS	100µl	100µl	53µl
TEMED	25µl	25µl	28µl

Die Proteinproben wurden in 4x Probenpuffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen (3.15) und 5min bei 96°C aufgeköcht, kurz abzentrifugiert und in die Geltaschen aufgetragen. Als Marker zur Abschätzung des Molekulargewichts wurde der RPN800- Marker von Amersham verwendet. Die Proben wurden in 1x SDS-Laufpuffer (3.15) bei 20mA für ca. 90-100min aufgetrennt, bis die Bromphenolblau-Bande des Probenpuffers die untere Gelkante erreicht hatte.

#### 4.3.2 Elektrophoretische Transfer auf Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membranen

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (NC-Membran) bzw. auf eine

Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-Membran) (3.4) transferiert werden. Dabei wandern die durch SDS stark negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld in Richtung Anode und binden als denaturiertes Protein irreversibel an die Membran (siehe Aufbau). Die benötigte Stromstärke ist proportional zur Fläche des Gels und beträgt  $0,8\text{mA/cm}^2$ .

Es wurde das ein Verfahren nach Kyhse-Anderson (1984) mit folgendem Aufbau zwischen zwei Graphit-Plattenelektroden verwendet:

Kathode (-)

---

9 Filterpapiere in Kathodenpuffer getränkt  
Gel  
NC- oder PVDF-Membran  
3 Filterpapiere in Anodenpuffer II getränkt  
6 Filterpapiere in Anodenpuffer I getränkt

---

Anode (+)

Der Transfer von Proteinen erfolgte für 90min bei einer Stromstärke von  $0,8\text{mA/cm}^2$  Gel.

(Verwendete Puffer siehe 3.16)

#### **4.3.3 Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf NC- bzw. PVDF-Membran**

Die auf der NC- bzw. PVDF-Membran gebundenen Proteine wurden indirekt durch proteinspezifische Antikörper nachgewiesen. Die proteinhaltige Membran wurde über Nacht in 3% BSA in PBS mit 0,1% TWEEN®20 geschwenkt und dadurch mit Protein abgesättigt. Es folgte

dreimaliges Waschen der Membran in PBS mit 0,1% TWEEN®20 für je 10 min. Der Blot wurde daraufhin mit dem spezifischen Erstantikörper in einer Verdünnung 1:1000-1:5000 in PBS mit 0,1% TWEEN®20 für 1h inkubiert. Anschließend wurde die NC dreimal in PBS mit 0,1% TWEEN®20 gewaschen und daraufhin 1h mit dem erstantikörperspezifischen Zweitantikörper inkubiert. Es wurde für den Nachweis mittels Odyssey-Gerät ein fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper und für den Nachweis mittels Chemolumineszenz ein Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper, verdünnt 1:1000-1:10000 in PBS mit 0,1% TWEEN®20, eingesetzt. Die Membran wurde nach der einstündigen Inkubation des Zweitantikörpers dreimal 10min in PBS mit 0,1% TWEEN®20 und einmal für 10min in PBS<sub>def.</sub> gewaschen. Danach schloss sich ein spezifischer Chemoluminiszenz-Nachweis (4.3.4) oder ein Nachweis am Odyssey®-Infrarot-Imaging System (4.3.5) an.

#### **4.3.4 Nachweis mittels Chemoluminiszenz**

Die an die Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase (POX) wurde durch Chemoluminiszenz mit SuperSignal® West Dura nachgewiesen. Dabei wurde dem Enzym als Substrat ein cyclisches Diacylhydrazid (Luminol) angeboten, das von POX oxidiert wird und dessen Elektronen in einen angeregten Zustand überführt. Beim Übergang in den Grundzustand wird die freiwerdende Energie als Licht emittiert. Dieses Licht wiederum kann einen Röntgenfilm schwärzen. Auf diese Weise lässt sich das Antikörper spezifisch-gebundene Protein auf dem Blot lokalisieren. Der Nachweis wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Expositionszeit des Röntgenfilmes variierte von 1s bis 2min.

#### 4.3.5 Nachweis mittels Odyssey®-Infrarot-Imaging System

Fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper, die kovalent an den Erstantikörper binden, können mit Hilfe des Odyssey®-Infrarot-Imaging System direkt nachgewiesen werden. Vorteile des Systems gegenüber dem Chemilumineszenz-Nachweis sind eine erhöhte Sensitivität, eine direkte Detektion sowie durch eine genaue Quantifizierung gegeben. Ebenfalls ermöglichen zwei unabhängige Diodenlaser eine Anregung bei 680nm und 780nm, so dass gleichzeitig zwei spezifische Zweitantikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern eingesetzt werden können.

#### 4.3.6 Nachweis exprimierter Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz

Diese mikroskopische Methode basiert auf einem spezifisch immunologischen Nachweis von zellulären oder viralen Antigenen in fixierten Zellen. Auf diese Weise kann die intrazelluläre Lokalisation in den verschiedenen Zellkompartimenten des jeweiligen Proteins gezeigt werden (*Fixierung mit Methanol-Aceton*), sowie seine Lokalisation an der Zelloberfläche (*Fixierung mit Paraformaldehyd*). Die Zellen wurden dazu bis zu einer Konfluität von 80% auf sterilen Deckgläschen, die in den Kulturschalen ausgelegt waren, herangezogen.

##### *Fixierung mit Methanol-Aceton:*

Die Deckgläschen wurden in eine Kulturplatte mit 24 Vertiefungen transferiert, zweimal mit eiskaltem PBS<sub>def.</sub> gewaschen und mit eiskaltem Methanol:Aceton (1VT:1VT) für 10-20min zur Fixierung überschichtet. Nach der Inkubation wurde der Überschuss abgesaugt und die Platte zum vollkommenen Abdampfen des Methanol-Aceton-Gemisches für 5min unter den Abzug gestellt. Die Zellen wurden als nächstes mit



Blockierungspuffer (3.19) für 5-10min rehydriert und konnten dann dem indirekten immunologischen Nachweis unterzogen werden. Durch die Behandlung mit Methanol/Aceton findet neben der Fixierung auch eine Permeabilisierung der Zellen statt.

*Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA):*

Die Deckgläschen wurden dreimal mit eiskaltem PBS<sup>++</sup> gewaschen und mit einer 3%igen Paraformaldehydlösung in PBS<sup>++</sup> für 20min bei RT fixiert. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und zur „Absättigung“ freier Aldehydgruppen des PFAs 10min mit 50mM Ammoniumchlorid in PBS<sup>++</sup> inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und waren dann für eine Darstellung der Oberflächenlokalisation eines exprimierten Proteins vorbereitet.

*Indirekter immunologischer Nachweis:*

Das mikroskopische Präparat, die fixierten Zellen, werden mit einem spezifischen Erstantikörper für 1Stunde inkubiert. Dieser wurde in Blockierungspuffer (3.19) 1:100-1:200 verdünnt und pro Glasplättchen 50µl dieser Lösung auf ein Stück Parafilm gegeben, der in einer feuchten Kammer lag. Danach wurde das Glasplättchen dreimal mit PBS<sub>def.</sub> gewaschen und mit einem FITC-gekoppelten Zweit-antikörper inkubiert, der gegen die Fc-Ketten des spezifischen Erst-antikörpers gerichtet war. Dieser FITC-Antikörper wurde 1:250 in Blockierungspuffer (3.19) verdünnt und 1 Stunde im Dunkeln inkubiert.

Danach wurden die Deckgläschen 3x in PBS<sub>def.</sub> und dann in dH<sub>2</sub>O gespült, um störende Salze zu entfernen und schließlich auf Filterpapier abgetropft. Die Deckgläschen wurden auf Objektträgern mit 10µl Mowiol fixiert. Nach dem die Eindeckflüssigkeit für mehrere Stunden im Dunkeln bei RT getrocknet wurde, können die Präparate direkt mittels Immunfluoreszenzmikroskopie ausgewertet werden. Die Präparate sind dunkel und kühl gelagert für Monate haltbar.

#### *Herstellung des Eindeckmediums:*

Es wurden 2,4g Mowiol 4-88 und 6g Glycerin in 6ml entionisiertem Wasser über Nacht gequollen. Danach wurden 12ml 0,2M Tris-Puffer (pH 8,5) dazugegeben und der Ansatz unter Rühren bei 50 bis 60°C erhitzt, bis sich alle Komponenten gelöst hatten. Es folgte die Zentrifugation bei 4000UpM für 15min und der klare Überstand wurde abgenommen und mit 10% (w/v) DABCO versetzt. Das fertige Eindeckmedium wurde aliquotiert bei –20°C gelagert und zur Verwendung frisch aufgetaut.

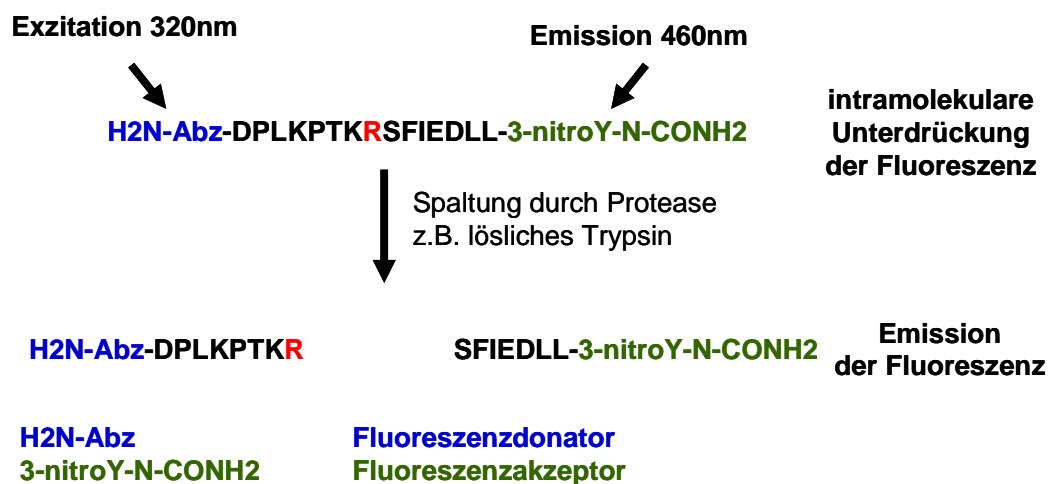
### **4.3.7 Endoglykosidasenbehandlung**

Um den Glykosylierungsstatus einzelner Proteine zu bestimmen, erfolgt ein Verdau mit spezifischen Endoglykosidasen. Endoglykosidase H (*EndoH*) katalysiert die Spaltung zwischen den beiden N-Acetylglucosaminresten mannosereicher Oligosaccharidketten. Peptid-N-Glykosidase F (*PNGaseF*) spaltet dagegen sowohl mannosereiche als auch komplexe N-glykosidisch gebundene Oligosaccharidseitenketten durch Hydrolyse der Bindung zwischen dem Asparaginrest des Proteins und dem Glykanrest des Zuckers. Zur Endoglykosidasebehandlung wurden die Enzyme *EndoH* und *PNGaseF* der Firma New England Biolabs entsprechend den Protokollangaben des Herstellers verwendet.

### **4.3.8 In-vitro Peptidspaltungstest**

Der in-vitro Peptidspaltungstest basiert darauf, dass die Fluoreszenzemission Fluoreszenz-markierter Peptide intramolekular unterdrückt wird (Abb. 6) (Lazure et al. 1998). Als Substrat für den Test dienten Oligopeptide, welche potentielle Spaltstellen des Spike-Proteins imitierten (Abb. 6). Der aminoterminaler Teil des Substrats dient als

Fluoreszenzdonator mit einer im UV-Licht fluoreszierenden 2-Aminobenzoyl-Gruppe(Abz). Der carboxyterminale Peptidanteil hingegen enthält einen 3-Nitro-Tyrosinrest als Fluoreszenzakzeptor, der die Fluoreszenz unterdrückt (*quenching*). Durch Spaltung des Substrats werden Fluoreszenz-donator und -akzeptor voneinander getrennt, so dass es zu einer Fluoreszenzsteigerung kommt. Dieser gemessene Anstieg in der Fluoreszenz zeigt die Enzymaktivität der getesteten Endoproteasen (*fluorescence dequenching*). Die Fluoreszenzmessungen wurden in schwarzen Platten mit 96 Vertiefungen mittels des Lumineszenz Spektrometer LS-55 (Perkin Elmer) durchgeführt.



**Abb. 6: Prinzip der intramolekular unterdrückten Fluoreszenz**

Nach Spaltung eines Oligopeptids durch eine Protease (z.B. Trypsin) kommt es zu einem Fluoreszenzanstieg der gemessen wird.

## 5 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurde das SARS CoV Spike-Protein (S-Protein), sowie seine Untereinheiten identifiziert. Darüber hinaus wurde die Spaltung des Proteins durch Endoproteasen und die funktionelle Bedeutung dieser Spaltung untersucht. Hierzu wurden ein Zell-Zell-Fusionstest und ein Peptidfluoreszenztest etabliert. Des Weiteren wurde eine Mutationsanalyse an potentiellen Spaltstellen in einem vektoriellen Expressionssystem durchgeführt.

### 5.1 Herstellung polyklonaler polyspezifischer Antiseren gegen das SARS CoV S-Protein

Als Voraussetzung für die Untersuchung wurden Kaninchen mit gereinigtem inaktiviertem Virus, bakteriell exprimiertem S-Protein und synthetischen Peptiden immunisiert. Diesen Kaninchen wurde vor der ersten und nach jeder weiteren Immunisierung Blut abgenommen und daraus Antiserum für immunologische Tests gewonnen.

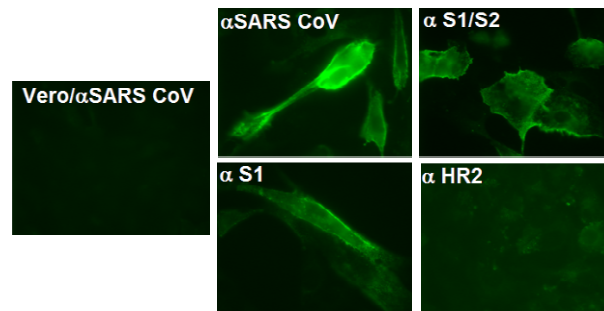
Darüber hinaus wurden auch die freundlicherweise von Dr. K. Stadler und Dr. J.D. Berry zur Verfügung gestellten Antikörper zum Nachweis des S-Proteins und seiner Fragmente eingesetzt.

## **5.2 Identifikation und Charakterisierung des SARS CoV S-Proteins mit etablierten und noch zu testenden Antikörpern**

### **5.2.1 Fluoreszenz-immunologische Darstellung des S-Protein in SARS CoV infizierten Vero-Zellen**

Zur Detektion und Lokalisation des S-Proteins wurden infizierte Vero-Zellen durch die Methode der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Hierzu wurden Vero-Zellen 24h vor der Infektion auf Deckgläschen ausgesät und bei einer Konfluenz von 80% mit einer MOI (Multiplicity of Infection) von 1 mit SARS CoV im Sicherheitslabor (BSL-4) infiziert. Eine Stunde nach Virusabsorption wurden die Zellen mit DMEM in Gegenwart von 2% FCS weiter inkubiert. Nach 24h wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA) über Nacht fixiert. Erst danach konnten die Zellen aus dem Sicherheitslabor ausgeschleust und das S-Protein mit den spezifischen Antiseren markiert und anschließend durch Inkubation mit einem FITC-gekoppelten anti-Kaninchenantikörper sichtbar gemacht werden. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Vero-Zellen, die wie die infizierten Zellen mit Antikörpern inkubiert wurden. Die polyklonalen polyspezifischen Antikörper  $\alpha$ SARS CoV,  $\alpha$ S1/S2 und  $\alpha$ S1 detektieren das S-Protein in der Oberflächen- (Abb 7) und der intrazellulären (Abb. 8) indirekten Immunfluoreszenz. Die Vero-Zellen zeigten mit keinem der verwendeten Antikörper eine spezifische Immunfluoreszenz. Aus diesem Grund ist hier exemplarisch für die Oberflächen- (Abb 7) und Intrazelluläre (Abb. 8) Immunfluoreszenz nur das Ergebnis des Antikörpers  $\alpha$ SARS CoV (Vero/ $\alpha$ SARS CoV) abgebildet.

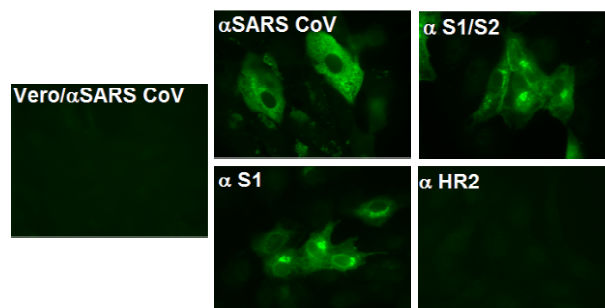
Für das S-Protein zeigte sich mit den Antiseren  $\alpha$ SARS CoV,  $\alpha$ S1/S2 und  $\alpha$ S1 eine homologe Verteilung an der Zell-Oberfläche. Mit dem  $\alpha$ HR2 Antikörper lässt sich kein S-Protein an der Zell-Oberfläche detektieren.



**Abb. 7: Oberflächen Immunfluoreszenz-Mikroskopie von SARS CoV infizierten Vero-Zellen**

Vero-Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit SARS CoV infiziert und 24h nach Infektion mit PFA fixiert. Als Kontrolle für die unspezifische Fluoreszenz der Antiseren dienten unbehandelte Vero-Zellen. Die fixierten Zellen wurden mit den anti-Spike-Antikörpern αSARS CoV, αS1/S2, αS1 und αHR2 inkubiert. Für die Fluoreszenzmarkierung wurde ein FITC-gekoppelten anti-Kaninchenantikörper eingesetzt. Die polyklonalen polyspezifischen Antikörper αSARS CoV, αS1/S2 und αS1 detektieren das S-Protein an der Zell-Oberfläche von infizierten Vero-Zellen. Der αHR2 Antikörper zeigt wie die mit αSARS CoV Antikörper behandelte Kontrolle keine Zell-Oberflächen Detektion des S-Proteins.

Intrazellulär lässt sich durch Detektion mittels der Antiseren αSARS CoV, αS1/S2 und αS1 eine Assoziation des S-Proteins an das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat feststellen. Der αHR2 Antikörper detektiert auch intrazellulär keine S-Protein. Die Vero-Zellen weisen keine intrazelluläre Immunfluoreszenz auf. Die Ergebnisse aller getesteten Antiseren sind im Anhang in Abb. 34 zusammengefasst dargestellt.



**Abb. 8: Intrazelluläre Lokalisation des Spike-Proteins in infizierten Vero-Zellen**

Vero-Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit SARS CoV infiziert und 24h nach Infektion mit PFA fixiert und anschließend permeabilisiert. Als Kontrolle für die unspezifische

Fluoreszenz der Antiseren dienten unbehandelte Vero-Zellen. Alle verwendeten Antikörper waren in der Kontrolle negativ. Deshalb wurde hier exemplarisch nur der  $\alpha$ SARS CoV abgebildet. Mit den Antikörpern  $\alpha$ SARS CoV,  $\alpha$ S1/S2 und  $\alpha$ S1 wurde das S-Protein intrazellulär detektiert. Es zeigte eine verstärkte Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat. Mit dem  $\alpha$ HR2 Antikörper konnte keine intrazelluläre Detektion des S-Proteins gezeigt werden.

### **5.2.2 Immunoblot zur Identifikation des S-Protein und seiner Untereinheiten in infizierten Vero-Zellen**

Vero-Zellen wurden in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät und bei einer Konfluenz von 80% mit einer MOI von 1 mit SARS CoV infiziert. Nach einer Virusvermehrung von 24-48h wurden die infizierten Zellen geerntet und inaktiviert. Als Kontrolle dienten die nicht infizierten Vero-Zellen. Das so erhaltene Proteingemisch wurde in der SDS-PAGE (4.3.1) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (3.4) übertragen. Das S-Protein und seine Untereinheiten wurden via Immunofärbung (4.3.3) unter Verwendung der Antiseren  $\alpha$ S1/S2,  $\alpha$ S1 und  $\alpha$ HR2 und eines Zweitantikörpers, der gegen Kaninchen Immunglobulin gerichtet ist, nachgewiesen (Abb. 11).

In der Grafik A (Abb. 9) ist die Aminosäuresequenz des C- und N-Terminus sowie der drei postulierten Spaltstellen dargestellt. Die Spaltstelle I an AS454-463 und die Spaltstelle II an AS676 sind multibasische Spaltnotive. Die Spaltstelle III an AS797 ist ein dibasisches Spaltnativ. Die Grafiken B und C (Abb. 9) zeigen schematisch die zu erwartenden Spaltprodukte (S1-S9) bei Einzel-, Doppel- und Dreifach-Spaltung des Volle-Länge S-Proteins. Die theoretisch errechneten molekularen Massen des S-Proteins (S0) und seiner Spaltprodukte (S1-S9) in glykosylierter und deglykosylierter Form sind in Abb. 10 zusammengefasst.



(B) und (C) stellen das S-Protein (S0) und seine Spaltprodukte (S1-S9) nach Einfach- und Mehrfach-Spaltung durch Endoproteasen dar. Die theoretisch errechneten Molekularen Massen (Peptid Mass; Swiss-Prot/TrEMBL) der Spaltfragmente sind in kDa angegeben.



<b>Voll-Länge S-Protein</b>		
	<b>glykosyliert</b>	<b>deglykosyliert</b>
	<b>kDa</b>	<b>kDa</b>
<b>S0</b>	<b>190</b>	<b>139</b>

<b>N-Terminale Fragmente</b>		
	<b>glykosyliert</b>	<b>deglykosyliert</b>
	<b>kDa</b>	<b>kDa</b>
<b>S1</b>	<b>130</b>	<b>88</b>
<b>S2</b>	<b>110</b>	<b>74</b>
<b>S3</b>	<b>81</b>	<b>51</b>

<b>C-Terminale Fragmente</b>		
	<b>glykosyliert</b>	<b>deglykosyliert</b>
	<b>kDa</b>	<b>kDa</b>
<b>S4</b>	<b>109</b>	<b>88</b>
<b>S5</b>	<b>80</b>	<b>65</b>
<b>S6</b>	<b>60</b>	<b>51</b>

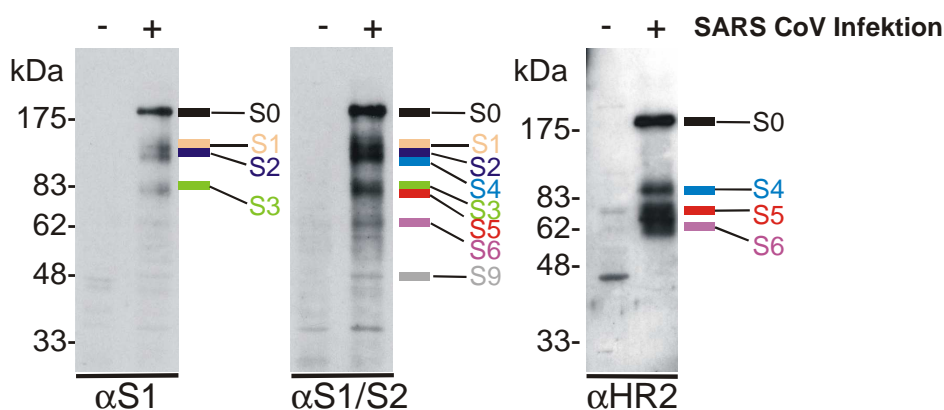
<b>Fragmente nach Doppelspaltung</b>		
	<b>glykosyliert</b>	<b>deglykosyliert</b>
	<b>kDa</b>	<b>kDa</b>
<b>S7</b>	<b>29</b>	<b>23</b>
<b>S8</b>	<b>20</b>	<b>14</b>
<b>S9</b>	<b>49</b>	<b>37</b>

**Abb. 10: Tabellarische Übersicht der theoretischen Molekularen Massen des S-Proteins (S0) und seiner C- und N-Terminalen Spaltfragmente (S1-S9) glykosyliert und deglykosyliert**

In dem Immunoblot (Abb. 11) wurden in den Spuren der SARS CoV infizierten Vero-Zellen die Banden für das S-Protein und seine Fragmente, im glykosylierten Zustand detektierten. An Hand der in der Kontrollspur auftretenden Banden zeigt sich die unspezifische Färbung des jeweiligen Antiserums.

Das  $\alpha$ S1 Antiserum ist gegen die N-terminalen Domäne des S-Proteins gerichtet und erkennt im Immunoblot die Banden des Volle-Länge Spike-Proteins bei 190kDa=S0, ein Spaltfragment bei 130kDa=S1, ein weiteres bei 110kDa=S2 und das Dritte S3 bei 81kDa (Abb. 11). Gegen den C-terminalen Bereich ist das Antiserum  $\alpha$ HR2 gerichtet. Es identifiziert in der Immunofärbung die Banden für die C-terminalen Fragmente S4-S6

(S4=109kDa, die für S5 bei 80kDa und S6 bei 60kDa) und des Vorläufers S0. Auch  $\alpha$ HR2 detektiert das Volle-Länge S-Protein bei 190kDa (Abb. 11). Das dritte Antiserum  $\alpha$ S1/S2 ist in der Lage sowohl den Vorläufer S0, als auch die C- und N-terminalen Spaltprodukte S1-S6 zu detektieren. Zusätzlich wurde noch eine Bande bei 49kDa erkannt, die der theoretischen molekularen Masse von S9 entspricht (Abb. 11). Die kleineren Fragmente S7 und S8 konnten im 10% SDS-PAGE nicht dargestellt werden.



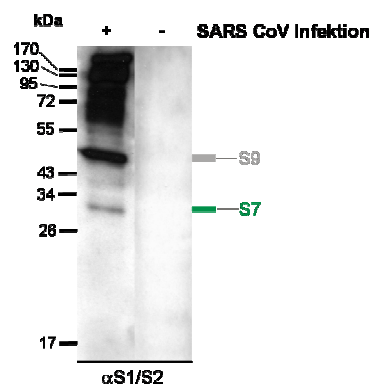
**Abb. 11: Immunoblot zum Nachweis des S-Proteins und seiner Untereinheiten aus infizierten Zellkulturüberständen**

Die Immunoblots zeigen die Detektion von in der SDS-PAGE aufgetrenntem und auf PVDF-Membran übertragenem SARS CoV S-Protein und seiner Untereinheiten. Als Probe wurden Extrakte SARS CoV infizierter Vero-Zellen sowie unbehandelter Zellen verwendet. Das Antiserum  $\alpha$ S1 erkennt spezifisch die N-terminalen Spaltfragmente (S1=130kDa, S2=110kDa und S3=81kDa),  $\alpha$ HR2 ist spezifisch gegen die HR2 Region im C-terminalen Bereich des S-Proteins gerichtet und erfasst die C-terminalen Spaltfragmente (S4=109kDa, S5=80kDa und S6=60kDa) und  $\alpha$ S1/S2 detektiert 7 Spaltprodukte (S1-S6) und ein Protein mit dem theoretischen Molekulargewicht von 49kDa, dass S9 repräsentiert. Alle drei Antiseren detektieren das Volle-Länge S-Protein (S0=190kDa).

Die näherungsweise Bestimmung der molekularen Massen anhand des Laufverhaltens in der SDS-PAGE erfolgte in kDa mittels des „Fermentas Prestained Protein Markers Broad Range“ (3.4)

Zur Identifikation der molekular kleineren Spaltfragmente wurde ein 15% SDS-PAGE verwendet. In der 15% SDS-PAGE wurden die Proteine der molekularen Masse von 60-20kDa aufgetrennt. Hier lässt sich mit dem Antiserum  $\alpha$ S1/S2 neben der Bande für S9 eine weitere Bande bei 29kDa detektieren. Dies entspricht damit der theoretischen molekularen Masse von S7.

Keins der getesteten Antiseren detektiert das theoretisch bei 20kDa liegende Spaltfragment S8.



**Abb. 12: Immunoblot zum Nachweis der Spaltprodukte mit geringer molekularer Größe (S7,S8 und S9)**

Der Immunoblot zeigt die Detektion von in der SDS-PAGE aufgetrennten und auf PVDF-Membran übertragenem SARS CoV S-Protein und seiner Untereinheiten. Das Antiserum  $\alpha$ S1/S2 erkennt neben den großen Banden bei 170-72 kDa (S0-S6) noch weitere Proteinbanden bei 49kDa und eine weitere bei 29kDa die dem Molekulargewicht von S9 und S7 entsprechen.

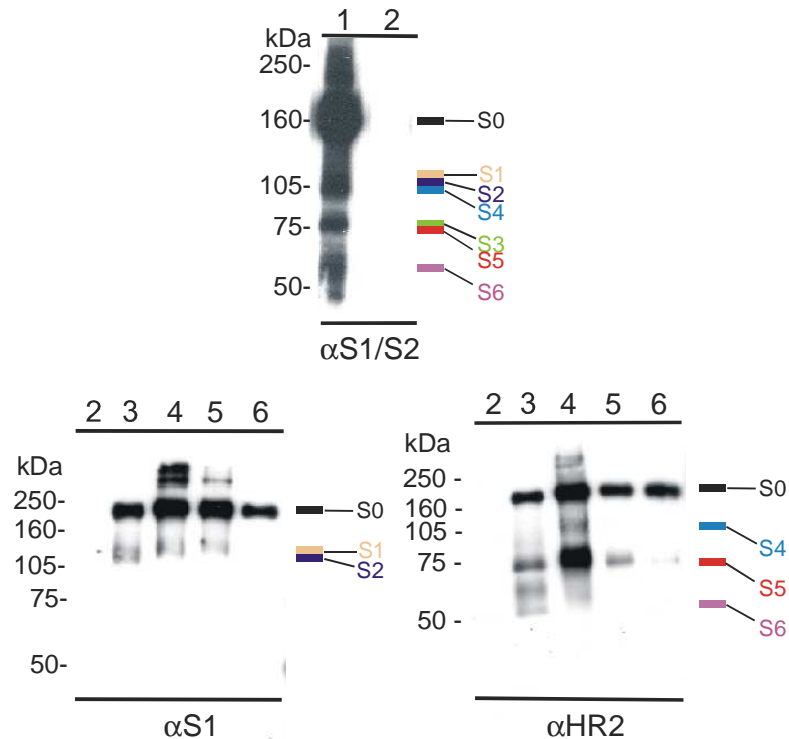
Die näherungsweise Bestimmung der molekularen Massen anhand des Laufverhaltens in der SDS-PAGE erfolgte in kDa mittels des „New England Biolabs Prestained Protein Markers Broad Range“ (3.4)

Die in den Immunoblots (Abb. 11 und Abb. 12) detektierten Spaltprodukte S1-S9 deuten auf eine Mehrfachspaltung des SARS CoV S-Proteins in infizierten Vero-Zellen hin.

Die getesteten mono- und polyklonalen Antiseren und die für sie erhaltenen Ergebnisse im Immunoblot, sowie in der Oberflächen- und Intrazellularen-Immunfluoreszenz sind im Anhang in Abb. 34 und 35 zusammengefasst dargestellt.

### 5.2.3 Identifikation des S-Proteins und seiner Spaltfragmente aus sedimentierten SARS CoV

Zellkulturüberstände von SARS CoV infizierten Vero-Zellen wurden per Ultrazentrifugation aufgereinigt. Hierfür wurde eine Zellkulturflasche mit zu 80% konfluenten Vero-Zellen ( $1 \times 10^7$  Zellen) mit SARS CoV der MOI 1 infiziert und 24-48h weiter kultiviert. Die Zellkulturüberstände wurden zuerst von Zelltrümmern befreit (4.1.5). Als Nächstes erfolgte die Aufreinigung der Proben durch eine Ultrazentrifugation über einen Optiprep Gradienten. Die so erhalten Proben wurden in SDS Proben Puffer aufgenommen und in der SDS PAGE nach Ihrer relativen Molekularen Masse aufgetrennt und auf PVDF Membran übertragen. Die S-Protein spezifischen Banden wurden durch die Antisera  $\alpha$ S1/S2,  $\alpha$ S1 und  $\alpha$ HR2 detektiert und durch einen Zweitantikörper, der gegen Kaninchen Immunglobulin gerichtet ist, dargestellt (Abb. 13). Als Negativkontrolle dienten gereinigte Zellkulturüberstände von unbehandelten Vero-Zellen. Für die Positivkontrolle wurden SARS CoV infizierte Vero-Zellkulturüberstände ohne Aufreinigung verwendet. Die Spuren 1 und 4-6 zeigen unterschiedliche Proben von aufgereinigten SARS CoV aus infizierten Vero-Zellkulturüberständen. Das Antiserum  $\alpha$ S1/S2 erkennt auch aus dem aufgereinigtem SARS CoV das Voll-Länge S-Protein (S0) und seine theoretische erwarteten 6 Spaltfragmente (S1=130kDa, S2=110kDa, S3=81kDa, S4=109kDa, S5=80kDa und S6=60kDa) siehe Spur 1 (Abb. 13). Der Antikörper  $\alpha$ S1 hingegen detektiert in der Viruspräparation nur noch die 190kDa (S0), 130kDa (S1) und die 110kDa (S2) große Bande (Abb. 13). Die 81kDa große S3 Untereinheit ist nach der Aufreinigung nicht mehr detektierbar. Das Antiserum  $\alpha$ HR2 erkennt im Immunoblot aus gereinigtem Virus Banden mit dem Molekulargewicht von 190kDa (S0), 109kDa (S4), 80kDa (S5) und 60kDa (S6). Auch hier tritt durch die Virus Präparation ein Verlust der Spaltprodukte S4 und S6 ein. Sie sind nicht mehr mit dem Antikörper detektierbar.



**Abb. 13: Immunoblot des S-Proteins und seiner Spaltfragmente aus aufgereinigtem Virus**

Zellkulturüberstände von SARS CoV infizierten Vero-Zellen wurden durch Ultrazentrifugation aufgereinigt. Die gereinigten Proben wurden in SDS PAGE nach ihre relativen Molekularen Masse aufgetrennt und auf PVDF Membran übertragen. Die Banden für das S-Protein und seine Spaltprodukte wurden von den Antiseren  $\alpha S1/S2$ ,  $\alpha S1$  und  $\alpha HR2$  erkannt. Das Antiserum  $\alpha S1$  erkennt auch aus gereinigtem Virus spezifisch Banden bei 190kDa (S0), 130kDa (S1) und 110kDa (S2).  $\alpha HR2$  hingegen detektiert spezifisch Banden bei 190kDa (S0), 109kDa (S4), 80kDa (S5) und 60kDa (S6) und  $\alpha S1/S2$  detektiert alle 6 Spaltprodukte(S1-S6). Alle drei Antiseren detektieren das Volle- Länge S-Protein (S0=190kDa).

Im Zuge der Virus Aufreinigung kommt es zum Verlust der S-Protein Spaltfragmente.

Spur 1 = gereinigtes SARS CoV

Spur 2 = neg. Kontrolle Vero-Zellen

Spur 3 = pos. Kontrolle SARS CoV infizierte Vero-Zellen

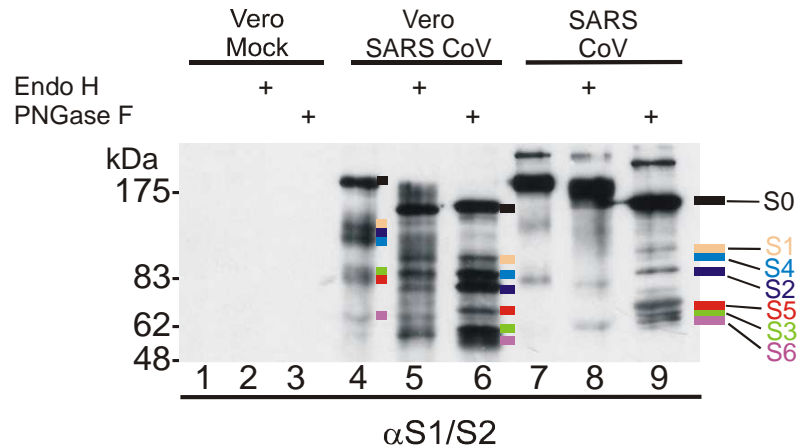
Spur 4-6 = unterschiedliche aufgereinigte SARS CoV Proben

Die näherungsweise Bestimmung der molekularen Massen anhand des Laufverhaltens in der SDS-PAGE erfolgte in kDa mittels des „Rainbowmarkers “ (3.4)

#### 5.2.4 Untersuchung zur Glykosylierung des S-Proteins und seiner Spaltfragmente durch Behandlung mit Endoglykosidasen

Anhand der Sensitivität für bestimmte kompartimentspezifische Glykosidasen können Aussagen über den intrazellulären Transport von Glykoproteinen getroffen werden. Während das Enzym *EndoH* nur mannosereiche Zucker abspaltet, die im Endoplasmatischen Retikulum (ER) angefügt werden, entfernt das Enzym *PNGaseF* auch komplexe Zucker, mit denen Glykoproteine erst im Golgi-Apparat modifiziert werden. Zelllysate von SARS CoV infizierten Vero-Zellen, eine Zellfreie Viruspräparation von SARS CoV und Überstände von unbehandelten Vero-Zellen (4.1.8) wurden mit *EndoH* und *PNGaseF* behandelt und anschließend mittels SDS-PAGE und Immunoblot untersucht. Die drei Proben wurden unbehandelt (Spur 1,4,7), sowie *EndoH* (Spur 2,5,8), oder *PNGaseF* (Spur 3,6,9) (4.3.7) behandelt und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Spuren 1-3 zeigen den unspezifischen Hintergrund von Vero-Zellen. In der Spur für die unbehandelte Vero SARS Probe stellt sich das typische Bandenmuster dar. Die S-Protein Banden S0-S6 (S0=190kDa, S1=130kDa, S2=110kDa, S3=81kDa, S4=109kDa, S5=80kDa und S6=60kDa) wurden detektiert. Für das gereinigte SARS CoV zeigt sich eine quantitative Verringerung der Spaltfragmente (Abb. 14, Spur 7-9). Die Proben Vero SARS und SARS CoV sind *EndoH* und *PNGaseF* sensitiv (Abb 14 Spur 5,6,8 und 9). Nach Behandlung mit Endoglycosidasen sind die teilweise und vollständig deglykosylierten Banden für die S-Proteinfragmente S0-S6 detektierbar. In Spur 5 und 8 wurden neben den teilweise deglykosylierten Proteinbanden auch die *EndoH* Resistenten als Banden mit diffusem Laufverhalten detektiert. Die Produkte nach vollständiger Deglykosylierung durch *PNGaseF* aus beiden Proben liegen für den Vorläufer S0 bei 139kDa, die Spaltprodukte S1 bei 88kDa, S2 bei 74kDa, S3 bei 51, S4 bei 88kDa, S5 bei 65kDa und S6 bei 51kDa (Abb. 14, Spur 6 und 9). Auch hier ist die Menge an nachweisbaren

Spaltprodukten in der SARS CoV Probe geringer als in der Vero SARS CoV Probe. Das SARS CoV S-Protein wird also über das ER und den Golgi-Apparat der Zelle transportiert. Diese Daten deuten weiter auf eine Mehrfachspaltung des S-Proteins hin.



**Abb. 14: Immunoblot der Endoglykosidase behandelten SARS CoV Proben**

Unbehandelten Vero-Zellkulturüberständen (Vero Mock), SARS CoV infizierten Zellkulturüberständen (Vero SARS CoV) und aufgereinigtes SARS CoV wurden mit *EndoH* und *PNGaseF* behandelt und anschließend durch SDS PAGE und Immunoblot untersucht. Das Antiserum  $\alpha$ S1/S2 detektiert sowohl die glykosylierten Formen sowie die nach Proteolyse mit *EndoH* und *PNGaseF* entstehenden teilweise oder komplett deglykosylierten Formen des Volle-Länge S0 und seiner Spaltfragmente S1 bis S6.

Spur 1-3 zeigt den unspezifischen Hintergrund der Vero-Zellen. Vero SARS CoV unbehandelt ist in Spur 4 dargestellt. Hier wurden das volle Länge S0 bei 190kDa, S1 bei 130kDa, S2 bei 110kDa, S3 bei 81kDa, S4 bei 109kDa, S5 bei 80 und S6 bei 60kDa detektiert. In Spur 7 beim SARS CoV ohne Endoglykosidase ist ein Teil dieser Spaltfragmente nach Aufreinigung nicht mehr detektierbar. Spur 5 und 8 zeigen die durch *EndoH* Behandlung teilweise deglykosylierten Vero SARS und SARS CoV Proben. Nach Behandlung durch *PNGaseF* sind in beiden Proben Spur 6 und 9 die deglykosylierten Formen S0-S6 (S0=139kDa, S1=88kDa, S2=74kDa, S3=51kDa, S4=88kDa, S5=65kDa und S6=51kDa) zu detektieren.

Die näherungsweise Bestimmung der molekularen Massen anhand des Laufverhaltens in der SDS-PAGE erfolgte in kDa mittels des „Fermentas Prestained Protein Markers Broad Range“ (3.4)

### **5.3 Etablierung und Charakterisierung einer solitär SARS CoV S-Protein exprimierenden Zelllinie**

Um das Spike-Protein weiter zu charakterisieren und die Bedeutung und Funktion der Spaltungen (z.B. Aktivierungsspaltung) weiter untersuchen zu können, wurde eine stabil SARS CoV S-Protein exprimierende Zelllinie etabliert. Hierfür wurde als Konstrukt das synthetisch hergestellte S-Protein von Nie Y. et al., 2004 verwendet. Bei diesem Konstrukt wurde zur Verstärkung der Expression die Aminosäuresequenz des Spike-Proteins an die humane Aminosäure- Codon- Nutzung angepasst, des Weiteren wurden die Signalsequenz des Plasminogen Aktivator und der cytoplasmatische Tail des Sendai Virus Oberflächenglykoproteins eingeführt.

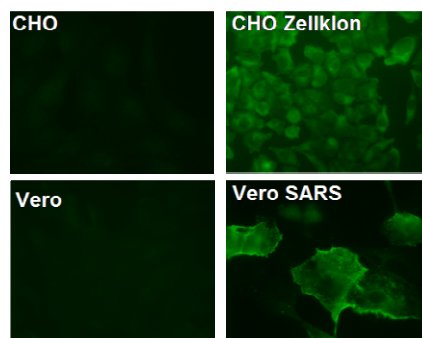
Für die stabile Transfektion wurden CHO-Zellen verwendet. Diese wurden in einer 9cm Zellkulturschale bis Sie eine Konfluenz von 80% kultiviert. Die Transfektion erfolgte durch Lipofectamin 2000 (3.1). Neben dem Spike-Protein trägt der Vektor pcDNA3.1 noch ein Gen für einen eukaryotischen Selektionsmarker (Geneticin). Durch Zugabe einer für nicht transfizierte Zellen letalen Konzentration Geneticin wurden Zellklone selektioniert, die das Geneticin-Gen in das zelluläre Genom integriert hatten. Der Nachweis der Integration des S-Proteins erfolgte sowohl mittels indirekter Immunfluoreszenz (4.3.6), als auch durch Immunofärbung (4.3.3).

#### **5.3.1 Fluoreszenz-immunologische Darstellung des S-Proteins aus solitär exprimierenden CHO-Zellen**

Zur Detektion und Lokalisation des stabil exprimierten S-Proteins wurden Geneticin positive Klone auf Deckgläschen ausgesät und bei einer Konfluenz von 80-90% entweder mit 4% PFA, oder Methanol/Aceton fixiert. Die Anwesenheit von S-Protein wurde anhand des spezifischen



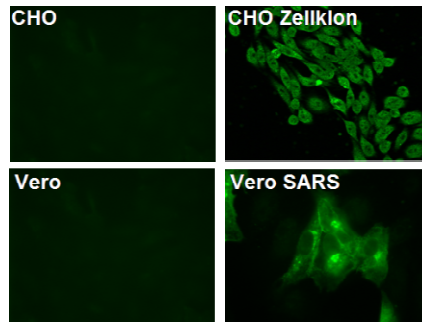
Antiserums  $\alpha$ S1/S2 getestet. Dieses Antiserum wurde anschließend durch Inkubation mit einem FITC-gekoppelten anti-Kaninchenantikörper detektiert. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte CHO-Zellen. In der Oberflächen Immunfluoreszenz zeigt sich nach solitärer Expression des S-Proteins (Abb. 4.1.7) die gleiche Verteilung wie in infizierten Vero-Zellen (Abb. 4.1.8). Der polyspezifische Antikörper  $\alpha$ S1/S2 zeigt eine homogene Zell-Oberflächen-Verteilung des S-Proteins. Die Negativkontrolle weist keine Oberflächen Immunfluoreszenz auf.



**Abb. 15: Oberflächen Immunfluoreszenz-Mikroskopie des solitär S-Protein exprimierenden Zellklons im Vergleich zu SARS CoV infizierten Vero-Zellen**

Der S-Protein positive Zellklon und SARS CoV infizierte Vero-Zellen wurde auf Deckgläschen kultiviert, fixiert mit 4% PFA und mit dem anti-Spike-Antikörper  $\alpha$ S1/S2 inkubiert. Zur Darstellung wurde ein FITC-gekoppelten anti-Kaninchenkörper eingesetzt. Der polyklonale polyspezifische Antikörper  $\alpha$ S1/S2 detektiert das S-Protein bei SARS CoV infizierten Vero-Zellen und beim stabilen Zellklon an der Zell-Oberfläche. Dort liegt es in homologer Verteilung vor. Als Kontrolle für die unspezifische Immunfluoreszenz des Antiserums dienten unbehandelte CHO-Zellen sowie unbehandelte Vero-Zellen. Diese zeigten keine Fluoreszenz.

Intrazellulär lässt sich, wie bei infizierten Vero-Zellen, durch Detektion per  $\alpha$ S1/S2 Antiserum auch bei solitärer Expression des S-Proteins eine Assoziation an das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat feststellen. Die Negativkontrolle weist keine intrazelluläre Immunfluoreszenz auf.



**Abb. 16: Intrazelluläre Lokalisation des S-Proteins nach solitärer Expression im Vergleich zu SARS CoV infizierten Vero-Zellen**

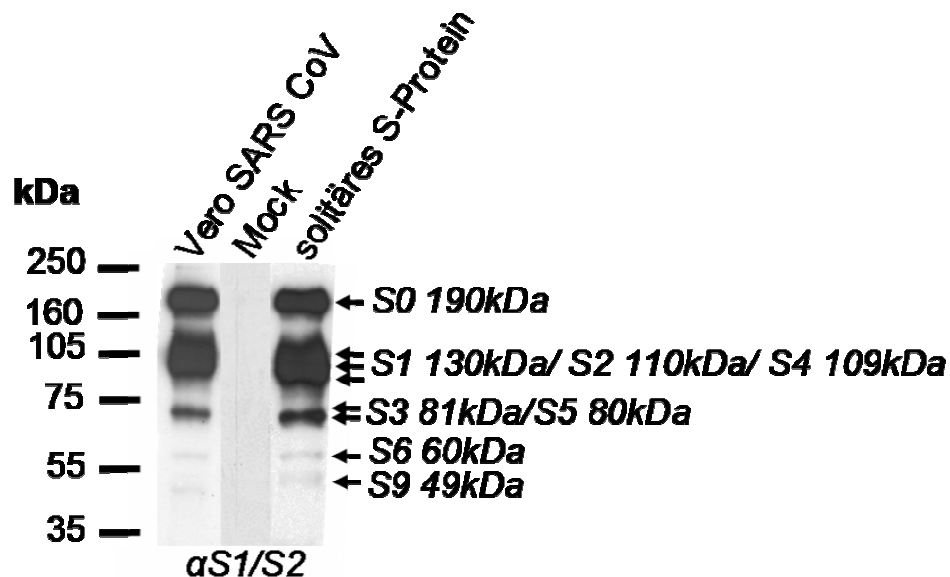
Mit den Antikörper  $\alpha$ S1/S2 wurde das S-Protein intrazellulär nach solitärer Expression und nach Infektion detektiert. Das S-Protein zeigt sowohl bei den infizierten Vero-Zellen, als auch nach solitärer Expression eine verstärkte Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat. Als Kontrolle für die unspezifische Fluoreszenz des Antiserums dienten unbehandelte CHO-Zellen und unbehandelte Vero-Zellen.

Das solitär exprimierte S-Protein verhält sich in der Oberflächen und intrazellulären Immunfluoreszenz wie S-Protein in infizierten Vero-Zellen.

### 5.3.2 Immunoblot zur Identifikation des S-Protein in solitär exprimierenden CHO-Zellen

Stabile Zellklone des S-Proteins wurde in Zellkulturschalen mit 6 Vertiefungen ausgesät und bei einer Konfluenz von 80-100% geerntet, die Proteine der Zellen wurden in SDS-Probenpuffer gelöst. Das in dem Zelllysate enthaltene Proteingemisch wurde in der SDS-PAGE (4.3.1) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (3.4) übertragen. Das S-Protein und seine Untereinheiten wurden mittels Immunofärbung (4.3.3) unter Verwendung des polyspezifischen Antiserums  $\alpha$ S1/S2 und eines Zweitantikörpers, der gegen Kaninchen Immunglobulin gerichtet ist, nachgewiesen (Abb. 17). Das solitäre S-Protein zeigt im Immunoblot das identische Bandenmuster wie SARS CoV infizierte Vero-Zellen. Die S-Proteinbanden für S0=190kDa, S1=130kDa, S2=110kDa, S4=109kDa,

S3=81kDa, S5=80kDa, S6=60kDa und S9=49kDa wurden vom polyklonalen polyspezifischen Antiserum  $\alpha$ S1/S2 erkannt. Das solitär exprimierte S-Protein verhält sich auch im Immunoblot wie das S-Protein aus SARS CoV infizierten Vero-Zellen.



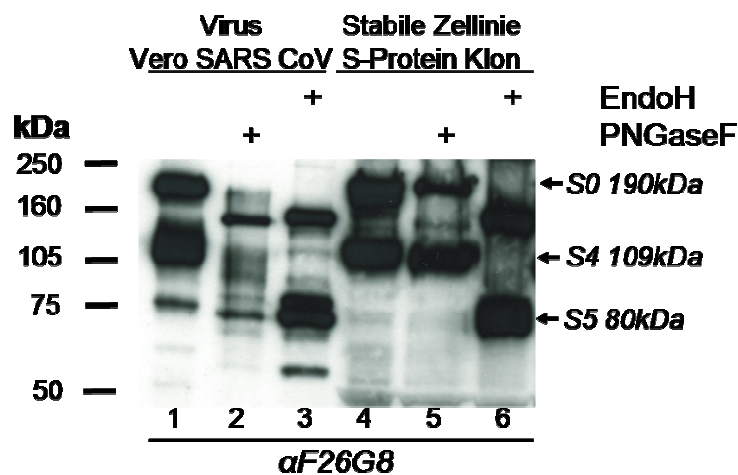
**Abb. 17: Immunoblot zur Charakterisierung des solitär exprimierten S-Proteins**

Der Immunoblot zeigt die Detektion von in der SDS-PAGE aufgetrennten und auf PVDF-Membran übertragenem solitär in CHO-Zellen exprimiertem S-Protein und seiner Untereinheiten. Das polyspezifische Antiserum  $\alpha$ S1/S2 hat sowohl in Vero SARS als, auch im S-Protein Zellklon den volle Länge S0 Protein Vorläufer bei 190kDa, sowie die Spaltprodukte S1=130kDa, S2=110kDa, S4=109kDa, S3=81kDa, S5=80kDa, S6=60kDa und S=9 bei 49kDa detektiert. Das solitär exprimierte S-Protein zeigt im Immunoblot das gleiche Bandenmuster wie in SARS CoV infizierten Vero-Zellen. Als Kontrolle für den unspezifischen Hintergrund des Antiserums wurden CHO-Zellen verwendet.

Die näherungsweise Bestimmung der molekularen Massen anhand des Laufverhaltens in der SDS-PAGE erfolgte in kDa mittels des „Rainbowmarkers“ (3.4)

### 5.3.3 Untersuchung zur Glykosylierung des solitär exprimierten S-Proteins und der Spaltfragmente durch Behandlung mit Endoglykosidasen

Wie oben schon an gereinigtem SARS CoV (5.2.4) dargestellt, wurde hier die Zugänglichkeit des solitär exprimierte S-Proteins für Endoglykosidasen und die Detektierbarkeit der Spaltprodukte im Vergleich zum Vero SARS untersucht. Als Antikörper wurde der Mausmonoklonale  $\alpha$ F26G8 verwendet.



**Abb. 18: Immunoblot des solitär exprimierten S-Proteins nach Behandlung mit Endoglykosidasen**

Mittels des  $\alpha$ Antikörper F26G8 wurden in der Vero SARS CoV Probe unbehandelt das ungespaltene S0 bei 190kDa, sowie die Proteinbanden für die Spaltprodukte S4 bei 109kDa und S5 bei 80kDa detektiert. Diese Banden zeigen nach Deglykosylierung die erwartete Reduktion des Molekulargewichts (S0=139kDa, S4=88kDa und S5=60kDa). Für den unbehandelten S-Protein Klon wurden nur die S0 und S4 Bande detektiert. Nach der Deglykosylierung wurden auch nur für S0 die 139kDa und für S4 die 88kDa Proteinbande detektiert.

Die näherungsweise Bestimmung der molekularen Massen anhand des Laufverhaltens in der SDS-PAGE erfolgte in kDa mittels des „Rainbowmarker“ (3.4)

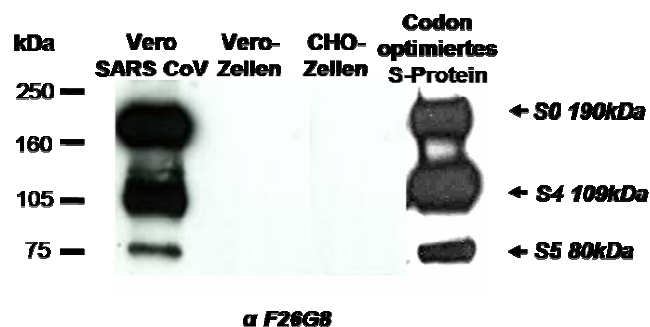
In der unbehandelten Vero SARS CoV Probe (Spur 1) wurden Proteinbanden für das ungespaltene S0, sowie die C-terminalen Spaltprodukte S4 und S5 detektiert. Diese waren sowohl *EndoH* (Spur 2), als auch

*PNGaseF* (Spur 3) sensitiv. Nach totaler Deglykosylierung ist S0 bei 139kDa, S4 bei 88kDa und S5 bei 60kDa detektierbar (Spur3). Für den S-Protein Klon zeigt sich ein anderes Bild. Unbehandelt wurden nur S0 und S4 detektiert. Nach *EndoH* Inkubation zeigt sich das ein Teil des ungespaltenen S0 und das S4 *EndoH* Resistent sind. Erst nach vollständiger Deglykosylierung wurde S0 bei 139kDa und S4 bei 88kDa detektiert. S5 wurde nicht aus dem S-Protein detektiert.

## 5.4 Identifikation der Mehrfachspaltung des S-Proteins

Monoklonale Antikörper sind immunologisch aktive Proteine, die von einer auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgehenden Zelllinie (Zellklon) produziert werden und die sich gegen ein einzelnes Epitop richten.

Der hier benutzte monoklonale Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. J.D. Berry zur Verfügung gestellt. Dieser Antikörper bindet an einer C-terminalen Region des S-Proteins.



**Abb. 19: Immunoblot zum Nachweis einer Mehrfachspaltung des S-Proteins**

Der Immunoblot zeigt die Detektion von in der SDS-PAGE aufgetrenntem, auf PVDF-Membran übertragenem und immunogefärbtem S-Protein und seiner Untereinheiten. SARS CoV infiziert Vero-Zelllysate und Zelllysate des S-Protein solitär exprimierenden CHO-Zellklons wurden verwendet. Der Maus-monoklonale Antikörper αF26G8 bindet C-terminal im S-Protein. Er erkennt neben dem ungespaltenen S-Protein S0 bei 190kDa noch zwei Spaltfragmente. Eines bei 109kDa, welches für S4 steht und ein weiteres bei 80kDa, welches für S5 steht. In den Spuren von Vero-Zellen und CHO-Zellen werden keine unspezifischen Banden detektiert.

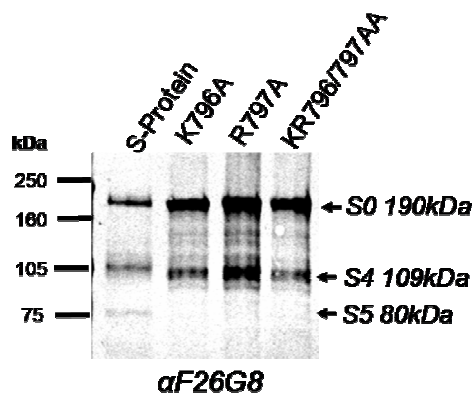
Die näherungsweise Bestimmung der molekularen Massen anhand des Laufverhaltens in der SDS-PAGE erfolgte in kDa mittels des „Rainbowmarkers“ (3.4)

Anhand eines Immunoblots wurden SARS CoV infizierte Vero-Zellen und der S-Protein solitär exprimierende CHO-Zellklon mit dem Antikörper untersucht. Als Kontrolle wurden unbehandelte Vero- und CHO-Zellen verwendet. Der monoklonale Antikörper erkennt sowohl bei infizierten Vero-Zellen wie auch bei solitär exprimiertem S-Protein aus CHO-Zellen drei Proteinbanden. Die 190kDa Bande steht für den Vorläufer S0. Die beiden andern sind C-terminale Spaltprodukte S4 bei 109kDa und S5 bei 80kDa. Der monoklonale Antikörper detektiert nur zwei Proteinbanden für das S-Protein, wenn dieses öfter als einmal gespalten wurde. Diese Daten sind ein erster Beweis für eine Mehrfachspaltung des S-Proteins.

## **5.5 Substitutionsanalyse der potentiellen Spaltstellen des S-Proteins**

Anhand der Substitutionsanalyse der drei postulierten Spaltmotive des S-Proteins sollte die Spaltstellen genauer charakterisiert werden. Durch einzel-, doppel- oder vierfach Substitution wurden die Spaltstellen verändert. Die Substitutionen wurden mittels rekombinanter PCR (4.2.2) eingeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind 3.7.2 aufgeführt. Nach Transfektion (4.1.6) und eukaryotischer Expression (4.1.7) der Konstrukte in CHO-Zellen wurden die Zellen geerntet. Das Proteingemisch der Mutanten und des unveränderten S-Proteins wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (3.4) übertragen. Das S-Protein und seine Untereinheiten wurden mittels Immunofärbung (4.3.3) unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers  $\alpha$ F26G8 und eines Zweitantikörpers, der gegen Maus Immunglobulin gerichtet ist, nachgewiesen. Die erzeugten Mutanten und die erhaltenen Ergebnisse sind in den Abb. 20 bis 22 dargestellt.

SARS Co-V Spike	790-PLKPTKRSFI-800
SARS Co-V Spike-K796A	790-PLKPTARSFI-800
SARS Co-V Spike-R797A	790-PLKPTKASFI-800
SARS Co-V Spike-K796A,R797A	790-PLKPTAASFI-800



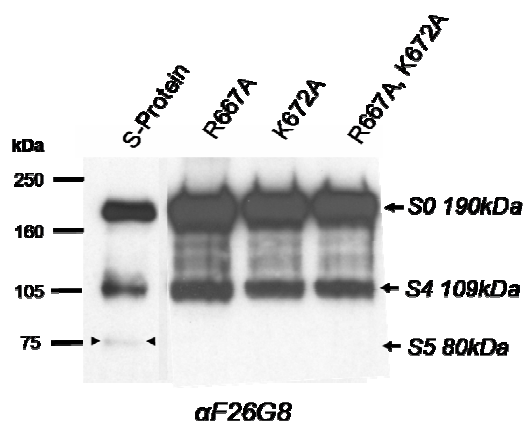
**Abb. 20: Immunoblot der Substitutionsmutanten an AS-Position R797**

Die Immunofärbung wurde mit dem Antikörper  $\alpha$ F26G8 inkubiert. Die Spur S-Protein zeigt die Banden für das unveränderte S-Protein (S0=190kDa, S4=109kDa, S5=80kDa). Bei den drei Mutanten der Spaltstelle K796A, R797A und K796A, R797A wurden die Proteinbande für S0 und S4 detektiert. S5 bei 80kDa konnte nicht mehr detektiert werden.

Die näherungsweise Bestimmung der molekularen Massen anhand des Laufverhaltens in der SDS-PAGE erfolgte in kDa mittels des „Rainbowmarkers“ (3.4)

Das Antiserum  $\alpha$ F26G8 detektiert nach transienter Expression des unveränderten S-Proteins drei Proteinbanden (Abb 20). Diese stehen für das ungespaltene S0 bei 190kDa und für die zwei C-terminalen Spaltfragmente S4 bei 109kDa und S5 bei 80kDa. Nach der Mutagenese PCR an der Spaltstelle K796, R797 war sowohl nach einzel- als auch doppel- Alaninsubstitution keine Proteinbande mehr bei 80kDa detektierbar. Das 109kDa große Spaltfragment für S4 konnte nachgewiesen werden.

SARS Co-V Spike	660-HTVSLLRSTS QKSIVAYTMS-680
SARS Co-V Spike-R677A	660-HTVSLL <del>A</del> STS QKSIVAYTMS-680
SARS Co-V Spike-K682A	660-HTVSLLRSTS Q <del>A</del> SIVAYTMS-680
SARS Co-V Spike-R667A,K682A	660-HTVSLL <del>A</del> STS Q <del>A</del> SIVAYTMS-680



**Abb. 21: Immunoblot der Substitutionsmutanten an AS-Position R667**

Die Immunofärbung wurde mit dem Antikörper  $\alpha$ F26G8 inkubiert. Die Spur S-Protein zeigt die Banden für das unbehandelte S-Protein (S0=190kDa, S4=109kDa, S5=80kDa). Bei den drei Mutanten der Spaltstelle R667A, K672A und R667A, K672A wurden die Proteinbande für S0 und S4 detektiert. S5 bei 80kDa konnte nicht mehr detektiert werden.

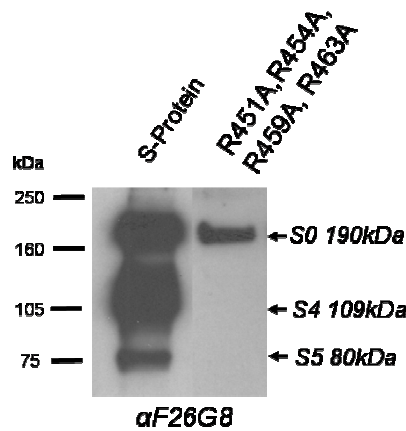
Die näherungsweise Bestimmung der molekularen Massen anhand des Laufverhaltens in der SDS-PAGE erfolgte in kDa mittels des „Rainbowmarkers“ (3.4)

Für die Spaltstelle R667K672 wurde das identische Ergebnis wie für die Spaltstelle K796, R797 erzielt (Abb. 21).

Die vierfach Alaninsubstitution an dem Spaltmotiv R451R454R459R463 führt dazu, dass außer dem ungespaltenen S0=190kDa keine weiteren Spaltprodukte des S-Protein mehr detektiert wurden. Für das unveränderte S-Protein wurden wieder die drei Proteinbanden (S0, S4 und S5) detektiert (Abb. 22)



SARS Co-V Spike 450-Y**RYLR**HGKL**RPFER**DI-465  
 SARS Co-V Spike-R451A, R454A, R559A, R463A 450-Y**AYLA**HGKL**APFEA**DI-465



**Abb. 22: Immunoblot der Substitutionsmutanten an AS-Position RRRR451-463**

Die Immunofärbung wurde mit dem Antikörper  $\alpha$ F26G8 durchgeführt. Die Spur S-Protein zeigt die Banden für das unbehandelte S-Protein (S0=190kDa, S4=109kDa, S5=80kDa). Bei der Substitutionsmutate der vier Arginine zu Alanin wurde nur noch das ungespaltene S-Protein S0=190kDa detektiert. Für die Spaltprodukte wurden keine Proteinbanden mehr detektiert.

Die näherungsweise Bestimmung der molekularen Massen anhand des Laufverhaltens in der SDS-PAGE erfolgte in kDa mittels des „Rainbowmarkers“ (3.4)

## 5.6 Untersuchung zur Spike-Protein Spaltung durch Endoproteasen mittels in-vitro Peptidspaltungstest

Um die Zugänglichkeit der postulierten Spaltstellen des Spike-Proteins für potentielle Proteasen zu testen, wurde ein in-vitro Peptidspaltungstest (4.3.8) durchgeführt. Es wurden fluoreszierende Peptide über die drei potentiellen Spaltstellen (Abb. 23) und als Negativkontrolle, eins mit einer Doppel Alanin Substitution an AS-position 796/797 (Abb. 23) synthetisiert. 10 $\mu$ M eines jeden fluoreszierenden Peptids dienten als Substrat für diese Untersuchung. Die Spaltung der Peptide resultiert in einem *dequenching* der Fluoreszenz, die anschließend gemessen werden kann. Die

Eigenfluoreszenz der Peptide ohne Protease wurde als Kontrolle gemessen. Sie war für alle verwendeten Peptide über die Zeit konstant (Abb. 24 A-D). Das zeigt, dass alle Peptide stabil sind und in 30 min nicht unspezifisch degradiert werden. Als Positivkontrolle wurden 10 U TPCK-Trypsin eingesetzt, da Trypsin in jedem Fall die Peptide an basischen Aminosäureresten Arginin spaltet. Im Versuchsansatz wurden die Enzyme Cathepsin L, Cathepsin B (jeweils 0,1mU) und Elastase (10 U) verwendet.

**1. Peptid K796**

H<sub>2</sub>N-Abz-DPLKPT**K**R**S**FIEDLL-3-nitroY-N-CONH<sub>2</sub>

**2. Peptid R667**

H<sub>2</sub>N-Abz-VSLL**R**ST**SQ****K**SIV-3-nitroY-N-CONH<sub>2</sub>

**3. Peptid R451R453R459R463**

H<sub>2</sub>N-Abz-NYKY**R**YL**R**HGKL**R**P**F**ER**R**DISN-3-nitroY-N-CONH<sub>2</sub>

**4. Peptid A796A797**

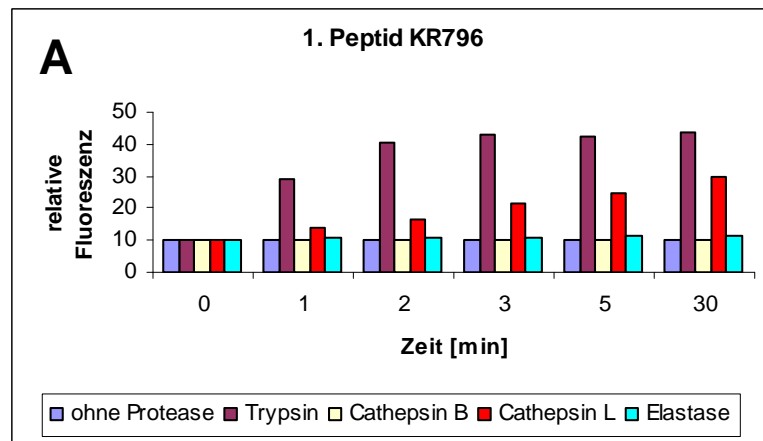
H<sub>2</sub>N-Abz-DPLKPT**A**A**S**FIEDLL-3-nitroY-N-CONH<sub>2</sub>

Abz = Fmoc 2 Aminobenzoessäure

3-nitro Y = 3-Nitrotyrosin

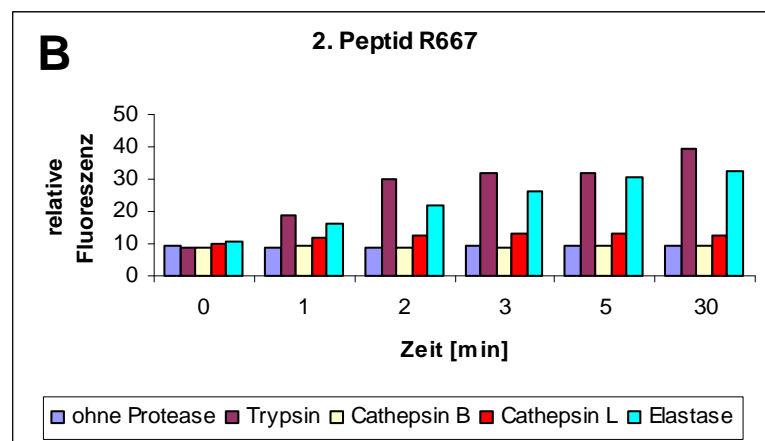
**Abb. 23: Übersicht der verwendeten Peptide**

Die Enzymaktivität wurde mit einem Perkin Elmer LS55 Spektrometer (Exzitation von 320nm, Emmission von 460nm) gemessen. Die relativen Fluoreszenzeinheiten für die einzelnen Enzyme zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 30 min sind in Abb 24 A-D aufgetragen.



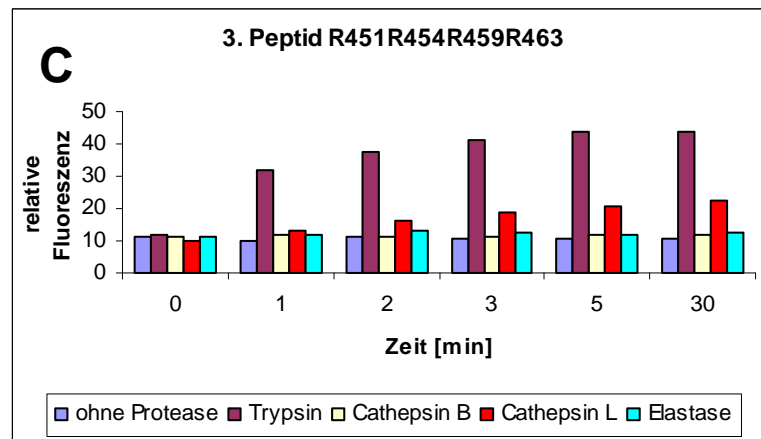
**Abb. 24 A: 1. Peptid KR796**

Das Diagramm stellt die Ergebnisse für das Peptid über die potentielle Spaltstelle KR796 dar. Dieses Peptid zeigt eine Fluoreszenzemission, durch Inkubation mit der Positivkontrolle Trypsin und Cathepsin L. Für Cathepsin B und Elastase ist kein Fluoreszenzanstieg messbar.



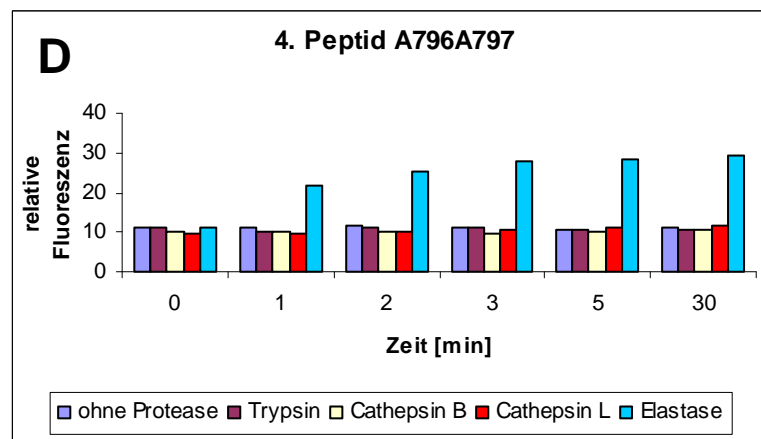
**Abb. 24 B: 2. Peptid R667**

Das Diagramm stellt die Ergebnisse für das Peptid über die potentielle Spaltstelle R667 dar. Es zeigt sich ein Anstieg der relativen Fluoreszenz nach Inkubation mit der Positivkontrolle Trypsin und Elastase. Bei Cathepsin B und L zeigt sich kein Fluoreszenzanstieg.



**Abb. 24 C: 3. Peptid R451R454R459R463**

Das Diagramm stellt die Ergebnisse für das Peptid über die potentielle Spaltstelle R451R454R459R463 dar. Dieses Peptid zeigt eine Fluoreszenzemission durch Inkubation mit der Positivkontrolle Trypsin und Cathepsin L. Die Cathepsin L Fluoreszenz ist im Vergleich zu Trypsin um ca. 50% schwächer. Für Cathepsin B und Elastase ist kein Fluoreszenzanstieg messbar.



**Abb. 24 D: 4. Peptid A796A797**

Das Diagramm stellt die Ergebnisse für das Peptid zur Trypsin Negativkontrolle dar. Dieses Peptid zeigt nur nach Inkubation mit Elastase einen Anstieg der Fluoreszenz. Bei Trypsin, Cathepsin B und L zeigt sich keine Fluoreszenz.

Die Inkubation der drei Peptide KR796, R667 und R451R454R459R463 mit TPCK-Trypsin führt wie erwartet zu einer Fluoreszenzemission (Abb. 24 A-C). Diese zeigt die Spaltung der Peptide an. Für die Negativkontrolle, das Peptid A796A797, wurde nach der Inkubation mit TPCK-Trypsin keine Fluoreszenzfreisetzung detektiert (Abb 24 D). Dieses Peptid enthält kein

Spaltmotiv für Trypsin, wurde somit nicht gespalten. Die Inkubation aller hier verwendeten Peptide mit Cathepsin B führt bei keinem zu einem Fluoreszenzanstieg (Abb. 24 A-D). Das bedeutet Cathepsin B spaltet *in vitro* an keiner der drei postulierten Spaltstellen des S-Proteins. Elastase spaltet wie erwartet nur die Trypsin Negativkontrolle A796A797 und das R667 Peptid, da nur in diesen Peptiden kleine ungeladen Aminosäuren für die Elastase Spaltung zugänglich sind.

Die Peptide KR796 und R451R454R459R463 zeigen nach Inkubation mit Cathepsin L einen deutlichen Fluoreszenzanstieg (Abb. 24 A u. D). Dieser fällt für KR796 stärker aus als für R451R454R459R463. Das KR796 erreicht im Vergleich zur Positivkontrolle TPCK-Trypsin eine fast genauso starke Fluoreszenz, während die relative Fluoreszenz für das R451R454R459R463 Peptid nur halb so stark ist wie die von TPCK-Trypsin. Das zeigt, dass nur zwei der vier potentiellen Spaltstellen *in vitro* durch Cathepsin L gespalten werden können. Diese Daten sind ein erster Hinweis auf die Cathepsin L Spaltung und deren Aminosäureposition im SARS CoV S-Proteins. Das A796A797 Peptid zeigt keine Fluoreszenzemission nach Cathepsin L Behandlung. Dies deutet weiter darauf hin, dass Cathepsin L das S-Protein nach dem Arginin an AS-Position 796 spaltet.

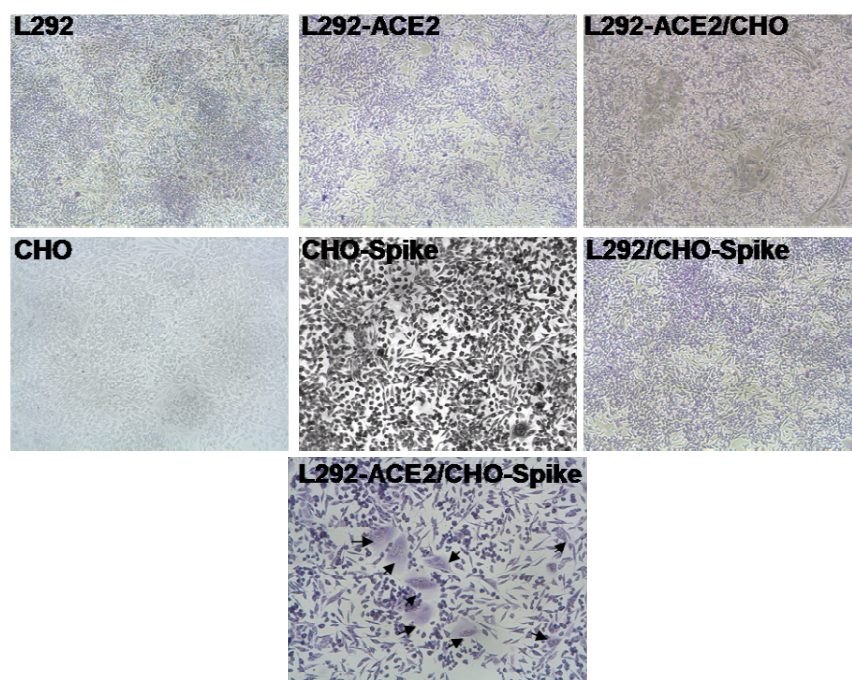
## 5.7 Fusionsaktivität von SARS CoV S-Protein

Um die biologische Aktivität von SARS CoV S-Protein zu erforschen wurde seine Fähigkeit Zell-Zell-Fusion zu vermitteln untersucht.

Für die Untersuchung wurde ein heterologer Zell-Zell-Fusionstest etabliert. Es wurde der in dieser Arbeit beschriebene stabile SARS CoV S-Protein exprimierende CHO-Zellklon verwendet (5.3.2). Der stabile Rezeptor (ACE2) exprimierende L292-Zellklon wurde freundlicherweise von der Gruppe um Prof. Dr. E. Snijder (Universität Leiden; Niederlande) zur

Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden für den Fusionstest heterolog im Verhältnis 1/20 (CHO-Spike/L292-ACE2) in 6cm Zellkulturschalen bis zu einer Dichte von 80-90% kultiviert. Die Fixierung der Zellen erfolgt für zehn Minuten in Methanol und zur besseren Darstellung der Zellen wurden diese mit Giemsa gefärbt. Die Dokumentation erfolgt mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Die mehrkernigen Zellen (Polykaryen) wurden gezählt und das Ergebnis wurde graphisch dargestellt. Diese Polykaryen stellen das Ergebnis einer Virus-induzierten Zell-Zell-Fusion (Synzytienbildung) dar.

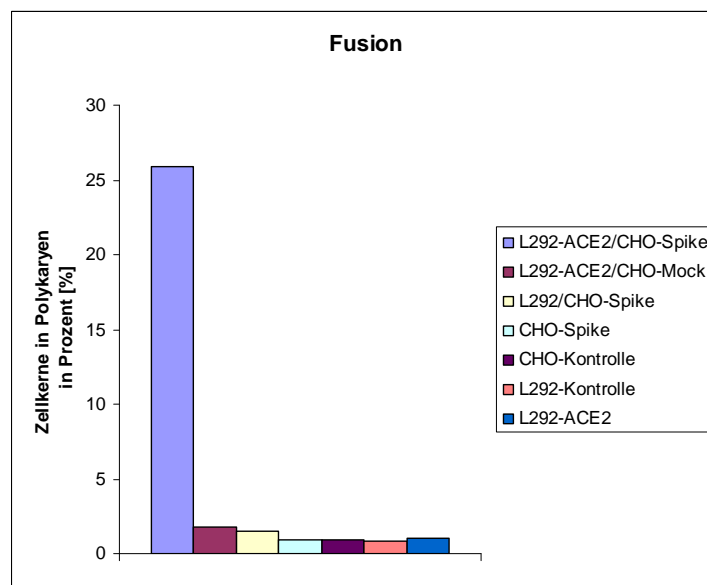
Die Bilder der CHO-Zellen (Abb. 25) zeigen einen gleichmäßig gewachsenen Zellrasen. Nur im Bild der kokultivierten L292-ACE2 und CHO-Spike-Zellen (Abb. 25) ist eine deutliche Bildung von Synzytien zu detektieren.



**Abb. 25: Lichtmikroskopische Aufnahmen des heterologen Zell-Zell-Fusion-Tests**

Gezeigt sind die L292 und CHO-Zellen homolog kultiviert, die stabil exprimierenden Zellen (CHO-Spike und L292-ACE2), sowie die Kontrollen der gemischten Zellen (L292-ACE2/CHO und L292/CHO-Spike). Bei keiner dieser Kulturen zeigen sich Synzytien. Im Bild der gemischt gewachsenen Zellen (L292-ACE2/CHO-Spike) ist Zell-Zell-Fusion anhand von Synzytienbildung zu sehen. Die Pfeile markieren beispielhaft Synzytien.

Zur graphischen Darstellung der Fusion wurden die Zellen von je fünf Bildausschnitten einer Zellart in Doppelbestimmung ausgezählt. Gezählt wurden alle Zellkerne eines Bildausschnitts, sowie die Zellkerne in Polykarion. Diese Zahlen wurden gemittelt und das Verhältnis der Kerne in Synzytien zur gesamt Anzahl an Kernen errechnet. Dargestellt wurde der prozentuale Anteil an Kernen in Synzytien (Abb 26). Als Synzytium wurden alle Zellen mit mehr als drei Kernen gezählt.



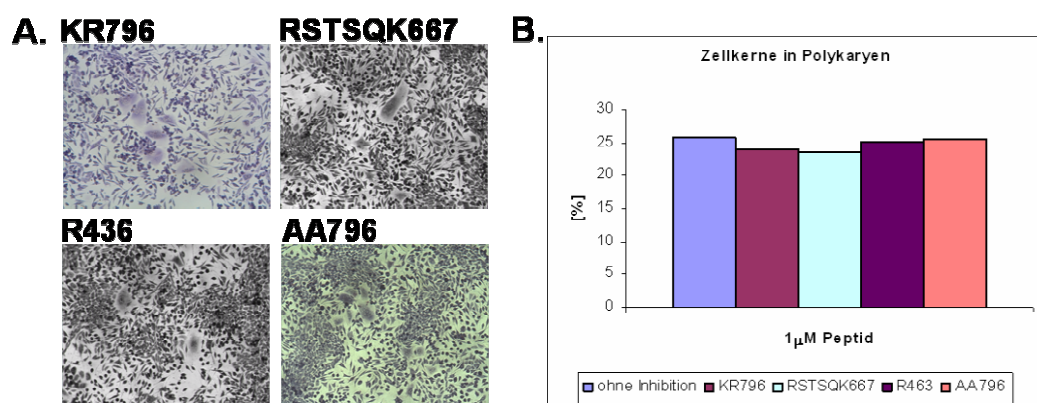
**Abb. 26: Darstellung des prozentualen Anteils der Zellkerne in Synzytien im Verhältnis zur Gesamtkernzahl**

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich in den CHO Zellen nur wenig Zellkerne in Synzytien befinden. Die Zahl liegt deutlich unter 5%, wobei sich in der heterologen Zellkultur aus Rezeptor (L-292-ACE2) und SARS CoV Oberflächenglykoprotein (Spike-Protein) 27% aller Zellkerne in Synzytien befinden. Dies zeigt das sowohl ACE2 als auch Spike-Protein für Zell-Zell-Fusion unerlässlich sind.

## 5.8 Untersuchung der Fusions-inhibitorischen Wirkung von Peptiden

Zur genaueren Untersuchung des Einflusses der Spaltung des SARS CoV Spike-Proteins auf die Zell-Zell-Fusion wurde versucht diese durch die Blockierung der möglichen Spaltstellen mittels Peptiden zu unterbinden, oder eine deutliche Reduktion zu erreichen. Dazu wurden die im Peptidspaltungstest untersuchten Peptide über die postulierten Spaltstellen des S-Proteins, sowie die AA796 Substitutionsmutation eingesetzt.

Die Mischung von L-ACE2- und CHO S-Protein-Zellen wurde in Anwesenheit von 1, 10 und 100µM der Peptide der jeweiligen postulierten Spaltstellen in 6cm Zellkulturschalen bis zu einer Zelldichte von 80-90 % kultiviert, fixiert und fotografiert (Abb. 27A, 28A u. 29A). Die graphische Darstellung der Fusionsinhibition erfolgte wie in Abschnitt 5.7 beschrieben. Dargestellt wurde der prozentuale Anteil an Kernen in Synzytien (Abb 27B, 28B u. 29B). Als Synzytium wurden alle Zellen mit mehr als drei Kernen gezählt.

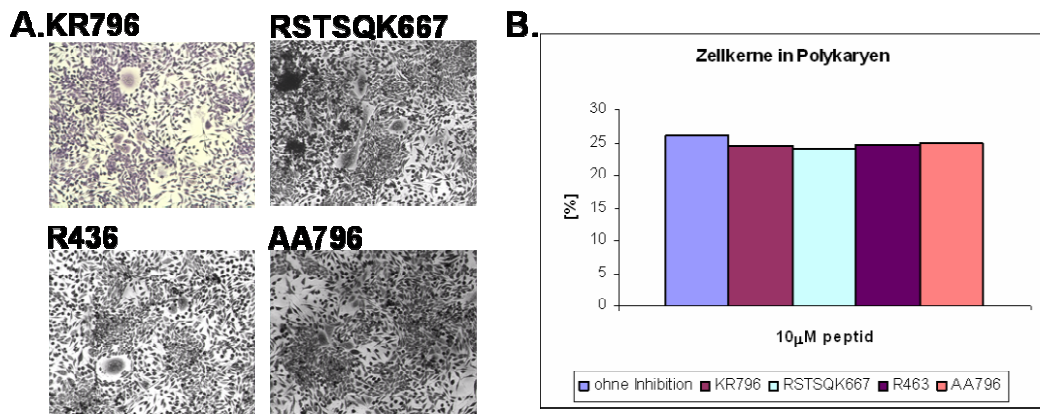


**Abb. 27: Lichtmikroskopische Aufnahmen und Graphische Darstellung der Zell-Zell-Fusionsinhibition mit 1µM Peptid**

A.:Gezeigt sind die als Kontrolle heterolog kultivierten L292/CHO-Spike Zellen. Diese zeigten keine Synzytienbildung. Die L292-ACE2/CHO-Spike die unter Anwesenheit von 1µM eines der jeweiligen Peptide über die postulierten Spaltstellen oder der AA796 Mutante kultiviert wurden zeigten alle Zell-Zell-Fusion anhand von Synzytienbildung.



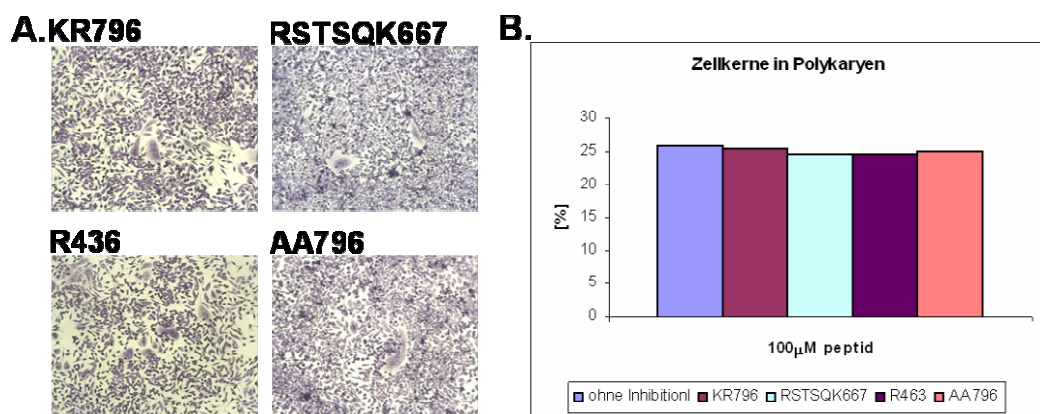
B.: Graphische Darstellung der inhibitorischen Wirkung von 1µM des jeweiligen Peptids auf den prozentualen Anteil der Zellkerne in Synzytien im Verhältnis zur Gesamt Zellkernzahl



**Abb. 28: Lichtmikroskopische Aufnahmen und Graphische Darstellung der Zell-Zell-Fusionsinhibition mit 10µM Peptid**

A.: Gezeigt sind die als Kontrolle verwendeten heterolog kultivierten L292/CHO-Spike Zellen. Diese zeigten keine Synzytienbildung. Die L292-ACE2/CHO-Spike die unter Anwesenheit von 10µM eines der jeweiligen Peptide über die postulierten Spaltstellen oder der AA796 Mutante kultiviert wurden zeigten alle Zell-Zell-Fusion anhand von Synzytienbildung.

B.: Graphische Darstellung der inhibitorischen Wirkung von 10µM des jeweiligen Peptids auf den prozentualen Anteil der Zellkerne in Synzytien im Verhältnis zur Gesamt Zellkernzahl



**Abb. 29: Lichtmikroskopische Aufnahmen und Graphische Darstellung der Zell-Zell-Fusionsinhibition mit 100µM Peptid**

A.: Als Kontrolle für diese Test wurden heterolog kultivierten L292/CHO-Spike Zellen verwendet. Diese zeigten keine Synzytienbildung. Die L292-ACE2/CHO-Spike die unter

Anwesenheit von 100µM eines der jeweiligen Peptide über die postulierten Spaltstellen oder der AA796 Mutante kultiviert wurden zeigten alle Zell-Zell-Fusion anhand von Synzytienbildung.

B.: Graphische Darstellung der inhibitorischen Wirkung von 10µM des jeweiligen Peptids auf den prozentualen Anteil der Zellkerne in Synzytien im Verhältnis zur Gesamt Zellkernzahl

Nach Auszählung der Kerne in Synzytien im Vergleich zu unbehandelten Zellen, lässt sich bei keiner der Konzentration 1,10 oder 100µM für eins der verwendeten Peptide eine inhibitorische Wirkung auf die Zell-Zell-Fusion feststellen (Abb 27-29).

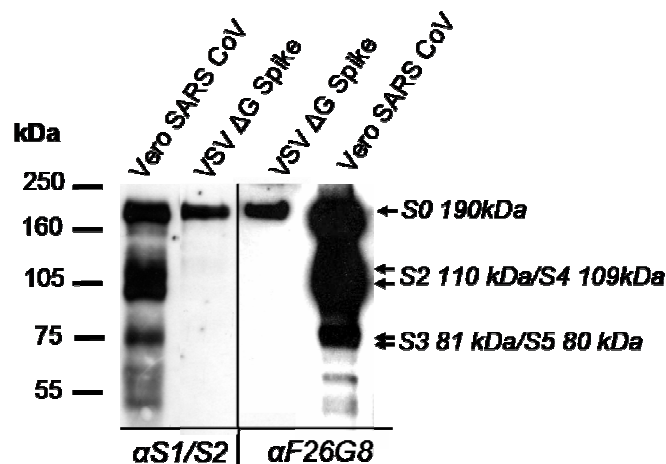
## 5.9 Charakterisierung des S-Proteins im VSV ΔG System

Es sollte herausgefunden werden ob gespaltenes S-Protein in die VSV ΔG Pseudotypen eingebaut wird. Des Weiteren sollte der Einfluss der Spaltung des S-Proteins auf die Infektiosität im VSV ΔG System untersucht werden. Hierfür wurde das S-Protein in ein replikationsdefizientes Vesikular–Stomatitis–Virus VSVΔG–G eingebaut. Im VSVΔG–G –Genom wurde das Gen für das Oberflächenprotein G deletiert, stattdessen kodiert das Genom für ein GFP–Gen. SARS CoV S-Protein exprimierende BHK-Zellen wurden mit diesem Virus infiziert und das entstehende VSV ΔG S-Protein Virus geerntet und sedimentiert. Das sedimentierte und in PBS<sub>def</sub> resuspendierte VSV ΔG S-Protein Virus wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. G. Herrler (Tiermedizinische Hochschule; Hannover) zur Verfügung gestellt.

### 5.9.1 Identifikation des S-Proteins und seiner Spaltprodukte aus VSV ΔG S-Protein Viren

Das VSV ΔG S-Protein Virus wurde in der SDS-PAGE untersucht. Hierfür wurden 30µl VSV ΔG Spike-Protein Virus Lösung in der SDS-PAGE (4.3.1) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (3.4) übertragen. Das S-Protein und seine Untereinheiten wurden mittels Immunofärbung (4.3.3) unter Verwendung der Antikörper αS1/S2 und αF26G8 markiert. Für das polyspezifische αS1/S2 wurde ein Zweitantikörper, der gegen Kaninchen Immunglobulin gerichtet ist verwendet, während für das Mausmonoklonale αF26G8 ein Zweitantikörper, der gegen Maus Immunglobulin gereicht ist eingesetzt wurde.

In diesem Experiment (Abb. 30) wurden Zelllysate von SARS CoV infizierte Vero-Zellen als Positivkontrolle herangezogen. In den Vero SARS Spur zeigt sich das typische Proteinbandenmuster für das S-Protein. Die Antiseren αS1/S2 und αF26G8 erkennen das ungespaltene S-Protein (S<sub>0</sub>) bei 190kDa und die Spaltproduktdoppelbanden S<sub>2</sub>/S<sub>4</sub> bei 110kDa und S<sub>3</sub>/S<sub>5</sub> bei 80kDa. In den VSV ΔG Spike Spuren wurden durch keinen der verwendeten Antikörper Spaltprodukte erkannt. Das bedeutet, dass in die VSV ΔG Viren nur ungespaltenes S-Protein eingebaut wurde (Abb. 30).



**Abb. 30: Immunoblot des VSV  $\Delta G$  S-Proteins**

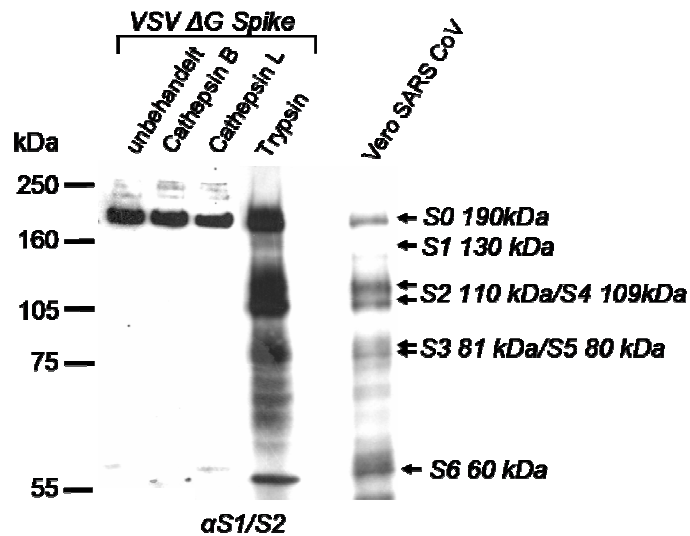
Der Blot zeigt für SARS CoV infizierten Zellkulturüberständen (Vero SARS) das typische Bandenmuster. Detektiert wurden S0 bei 190kDa, die Doppelbande S2/S4 bei 110kDa/109kDa und die Doppelbande S3/S5 bei 81kDa/80kDa. Weder mit  $\alpha S1/S2$  noch mit  $\alpha F26G8$  Antikörper sind S-Protein Spaltprodukte in den VSV  $\Delta G$  Spike Pseudoviren zu detektieren.

Die näherungsweise Bestimmung der molekularen Massen anhand des Laufverhaltens in der SDS-PAGE erfolgte in kDa mittels des „Rainbowmarkers Broad Range“ (3.4)

### 5.9.2 Nachspaltung des VSV $\Delta G$ Spike mit potentiellen Endoproteasen

An Hand des ungespaltenen S-Proteins auf den VSV  $\Delta G$  Viren wurden potentielle Proteasen getestet. Die Kandidaten waren Trypsin, Cathepsin B und Cathepsin L. Im diesem Versuchsansatz wurden 50 $\mu$ l einer VSV  $\Delta G$  S-Protein Viruslösung mit den Enzymen Cathepsin L, Cathepsin B (jeweils 0,1mU) und Trypsin (10 U) für 15min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben mittels SDS-PAGE (4.3.1) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (3.4) übertragen. Das S-Protein und seine Spaltfragmente wurden mittels Immunofärbung (4.3.3) unter Verwendung der Antiseren

$\alpha$ S1/S2 und eines Zweitantikörpers, der gegen Kaninchen Immunglobulin gerichtet ist, nachgewiesen.



**Abb. 31: Immunoblot des auf VSV  $\Delta$ G Viren nachgespaltenen S-Proteins**

Der Immunoblot zeigt die detektierten S-Proteinbanden der unbehandelten und der mit Cathepsin B, Cathepsin L und Trypsin inkubierten VSV  $\Delta$ G S-Protein Viren. Vero SARS CoV dient als Positivkontrolle. Nur mit Trypsin lässt sich das identische Bandenmuster der S-Proteinspaltung der SARS CoV infizierten Vero-Zelllysate generieren. Für Cathepsin B und L wurden keine Spaltfragmente detektiert.

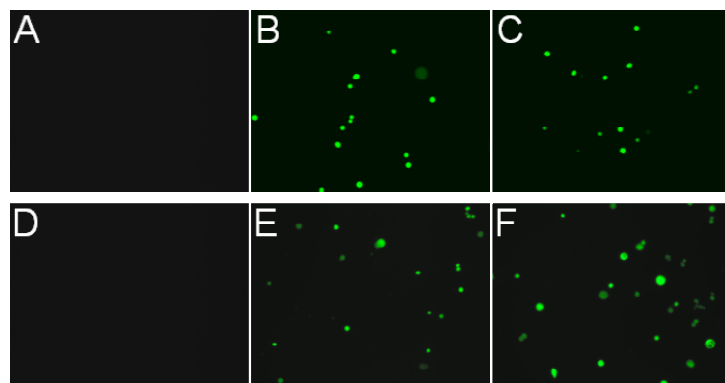
Die näherungsweise Bestimmung der molekularen Massen anhand des Laufverhaltens in der SDS-PAGE erfolgte in kDa mittels des „Rainbowmarkers Broad Range“ (3.4)

Das Ergebnis in Abb. 31 zeigt, dass weder Cathepsin B noch L in der Lage sind das S-Protein auf den VSV  $\Delta$ G Viren nach zu spalten. Nur durch Inkubation mit Trypsin wurde eine Spaltung des S-Proteins erreicht. Die erhalten Proteinbanden der Spaltprodukte waren identisch mit denen in SARS CoV infizierten Zellkulturüberständen. Es wurden die Proteinbanden für S0-S6 detektiert (Abb. 31).

### 5.9.3 Infektionsstudien mit dem VSV $\Delta$ G S-Protein Virus

VSV löst einen zytopathischen Effekt (CPE) aus. Dies führt bei erfolgreicher Infektion zur Abrundung der Zellen und Loslösung aus dem

Zellverband mit anschließender Zelllyse. Die Infektion kann durch die GFP-Expression der infizierten Zellen 24h nach der Infektion im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M) beobachtet und dokumentiert werden. Die Virusadsorption an Vero- und CHO-Zellen erfolgte in Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS<sub>def</sub>, wurden die Zellen mit Virussuspension in Kulturmedium mit 1% FKS für eine Stunde im Brutschrank auf dem Schwenktisch infiziert.



**Abb. 32: GFP-Fluoreszenz der VSV  $\Delta$ G Spike infizierten Vero- und CHO-Zellen**

Die infizierten Vero- und CHO-Zellen waren aufgrund des CPE abgelöst und abgekugelt. Bild A und D zeigen die uninfizierten Vero- und CHO-Zellen als Kontrolle. Die Bilder B und E zeigen die mit unbehandelte VSV  $\Delta$ G Spike Viren infizierten Zellen. In den Bilder C und F wurden die Zellen mit Trypsin behandelten VSV  $\Delta$ G Spike Viren infiziert. Das S-Protein auf der Oberfläche dieser Viren war gespalten. Die Spaltung des S-Proteins führte hier nicht zu einer Erhöhung der Infektiosität der VSV  $\Delta$ G Spike Viren

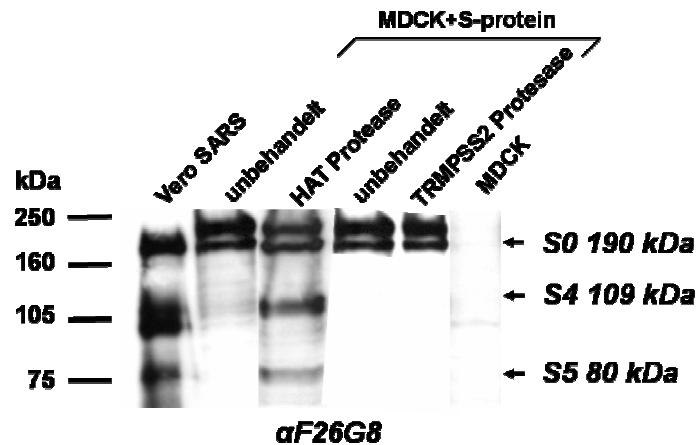
Nach der Infektion wurden die Vero- und CHO-Zellen wiederum zweimal mit PBS<sub>def</sub> gewaschen und mit Kulturmedium mit 1% FCS weiter 24h im Brutschrank kultiviert. Als Kontrolle wurden uninfizierte Vero- (Abb. 32 A) und CHO-Zellen (Abb. 32 D) im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die mit VSV  $\Delta$ G S-Protein infizierten Zellen zeigten die typische grüne GFP-Fluoreszenz und der CPE war zu erkennen (Abb. 32). Die Zellen wurden mit ungespaltenem (Abb. 32 B und E) und mit TCPK-Trypsin nachgespaltenem VSV  $\Delta$ G Spike Viren (Abb. 32 C und F) infiziert. Die Nachspaltung des S-Proteins führte nicht zu einer höheren Zahl an infizierten Zellen im Vergleich zum unbehandelten Virus. Das bedeutet im

VSV  $\Delta$ G Spike System wurde kein Einfluss der Spaltung des S-Proteins auf die Infektiosität nachgewiesen.

#### **5.9.4 Identifikation der Spaltung des S-Proteins via Serinproteasen des Respirationstrakts**

Die *human airways trypsin-like protease* (HAT) und TRMPSS2 sind zwei Serinproteasen, welche im Respirationstrakt des Menschen vorkommen. Sie sind für die proteolytische Aktivierung des Oberflächenglykoprotein Hämagglutinin (HA) von Influenzaviren verantwortlich. Diese Spaltung hat bei den Influenzaviren einen Einfluss auf die Infektiosität und die Ausbreitung (Böttcher E. et al, 2006).

Hier wurde untersucht, ob diese Serinproteasen auch das S-Protein des SARS CoV spalten und welche Spaltfragmente entstehen. Die transiente Expression des S-Proteins wurde in MDCKII-Zellen, welche die Protease induzierbar enthielten, durchgeführt. Diese MDCKII-Zellen mit der jeweiligen Protease wurden freundlicherweise von E. Böttcher aus der AG Garten zur Verfügung gestellt. Das Gen für die Protease steht in diesen Zellen induzierbar unter der Kontrolle eines Doxycyclin-Promotors. Erst nach Zugabe von Doxycyclin wurde die entsprechende Protease HAT oder TMPRSS2 exprimiert.



**Abb. 33: Immunoblot der HAT und TRMPSS2 Nachspaltung**

Die Immunofärbung wurde mit dem Antikörper  $\alpha$ F26G8 durchgeführt. In der Vero SARS und der HAT Probe wurden die Spaltprodukte S0=190kDa, S4=109kDa und S5=80kDa erkannt. Für TRMPSS2 wurde keine Spaltung detektiert. Die MDCK Spur zeigt den Hintergrund der MDCKII-Zellen. In den transient S-Protein exprimierenden MDCKII-Zellen wird noch eine Bande größer 190kDa detektiert. Diese kann durch andere Faltung des Proteins oder andere Glykosylierung entstanden sein.

Die näherungsweise Bestimmung der molekularen Massen anhand des Laufverhaltens in der SDS-PAGE erfolgte in kDa mittels des „Rainbowmarkers“ (3.4)

Für TRMPSS2 ist keine Spaltung des S-Proteins erkennbar. Nur die HAT Protease spaltet das S-Protein in die Proteinbanden der Größe der Spaltprodukte in SARS CoV infizierten Zellen. Mit dem Mausmonoklonalen Antikörper  $\alpha$ F26G8 wurden in den beiden Spuren Vero SARS und HAT Protease die Proteinbanden für S0=190kDa, S4=109kDa und S5=80kDa detektierbar (Abb. 33). Hier wurde gezeigt das neben Cathepsin L auch noch HAT in der Lage war das SARS CoV S-Protein zu spalten.



## 6 DISKUSSION

### 6.1 Identifikation des Spike-Proteins und der aus der Primärsequenz deduzierten Spaltstellen

Bei Coronaviren wird die Spaltung des Spike-Protein und dessen Funktion seit Jahren kontrovers diskutiert. Bei nahen Verwandten des SARS CoV, Vertreter der Gruppe II der Coronaviren, konnte eine Spaltung des Spike-Proteins durch Endoproteasen gezeigt werden. Für das Maus Hepatitis Virus (MHV), Vogel Bronchitis Virus (IBV) und Truthahn Coronavirus (TGEV) konnte die Spaltung an einem multibasischen Spaltmotiv der Bauart R-X-X-R, das homolog zum dibasischen K-R Motiv an Position 796 des SARS CoV Spike-Proteins liegt, nachgewiesen werden siehe Abb. 34 (Sturman et al., 1985; Stauber et al., 1993; Evelyne et al., 1995; Bos et al., 1997; Yamada et al., 1998).

<b><u>dibasisches Peptid</u></b>		<b>AS797</b> ↓
<b>SARS CoV</b>	GFNFSQILPDPLKPT-----	<b>KRS</b> FIEDLLFNKVTL
<b>FIPV</b>	GGLYFDGLSSLPPKIG-----	<b>KRS</b> AVEDLLFNKVTS
<b><u>basisches Tetrapeptid</u></b>		
<b>PRCoV</b>	GFWLEGLKYILPSDNSK-----	<b>RKYR</b> SAIEDLLFSKVTS
<b>TGEV</b>	GSWLEGLKYILPSHNSK-----	<b>RKYR</b> SAIEDLLFDKVTS
<b>IBV</b>		--- <b>RFRR</b> ---
<b>MHV-A59</b>		--- <b>RAHR</b> ---
<b><u>monobasisch Peptid</u></b>		
<b>HCoV 229E</b>	DYNLSSVIPSLPTSGSRVAG-----	<b>R</b> SAIEDILFSKIVTS

**Abb. 34: Sequenzvergleich der Spike-Protein Spaltstellen verschiedener Coronaviren**

Das Arginin an AS-Position 796 ist hoch konserviert bei den Coronaviren.

Die Spaltung erfolgt bei diesen Viren vor der Bildung der Virionen und deren Freisetzung aus der Wirtszelle. Aus der Spaltung resultieren ein 90kDa große S1 Domäne und eine nicht kovalent gebundene membranverankerte S2 Domäne mit einer Masse ebenfalls von 90 kDa (Jackwood et al., 2001). Es wurde postuliert, dass die S1 Untereinheit der Coronaviren mit spaltbarem S-Protein, die Rezeptorbindedomäne und Virus-neutralisierende Epitope enthält. Die S2 Untereinheit ist bei diesen Viren am Fusionsprozess während der Virusinvasion in die Wirtszelle maßgeblich beteiligt ist (Rota et al., 2003). Inzwischen wurde für das SARS CoV die Rezeptorbindestelle auf der S1 Domäne nachgewiesen (Li et al., 2005; Wong et al., 2004; Prabakaran et al., 2004) und das Fusionspeptid auf der S2 Untereinheit nahe des N-terminus identifiziert (Sainz et al., 2005).

Die Spaltung des SARS CoV Spike-Protein wurde an infizierten Vero-Zellen entdeckt (Wu et al., 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, das SARS CoV Spike-Protein durch Furin in Fragmente der Größen von 110 und 80kDa gespalten wird (Bergeron et al., 2004). Hier wird ein Arginin an Aminosäure-Position 667 als Spaltmotiv benannt. Bei der Infektion von Vero-Zellen mit rekombinanten Vaccinia Virus welches das SARS CoV Spike-Protein trägt wurden ebenfalls Spaltprodukte detektiert. Diese sind 120 und 70kDa groß, was zur Annahme des R-N-T-R Spaltmotivs an AS-Position 761 führte (Xiao et al., 2003).

Somit sind zwei Spaltstellen publiziert und zwei weitere werden aufgrund der Daten dieser Arbeit postuliert (Abb. 35).

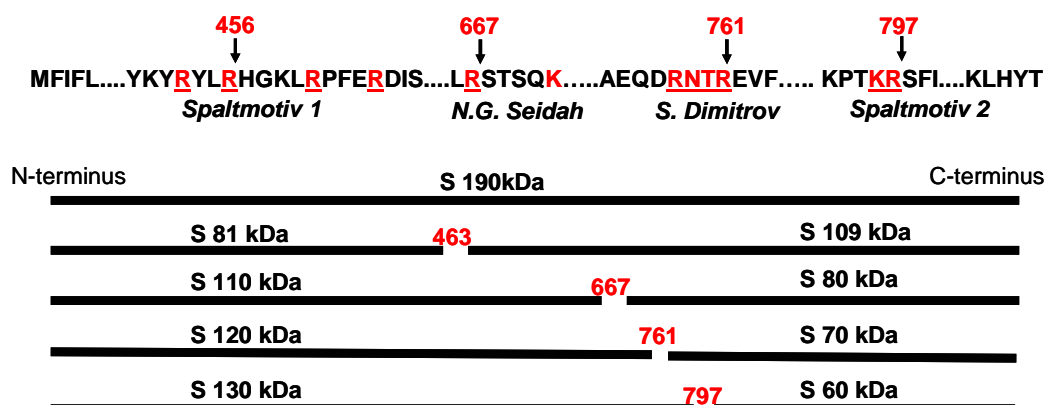


Abb. 35: Schematische Darstellung der SARS CoV Spike-Protein Spaltstellen

Es wurden polyklonale Antiseren gegen das SARS CoV Spike-Protein hergestellt und immunochemisch getestet. Mit den polyklonalen Antikörpern  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S1/S2 und  $\alpha$ HR2 wurden das Spike-Protein und seine Untereinheiten erstmals nachgewiesen. Es wurden mehr als drei Proteinbanden detektiert, dies war ein erstes Indiz für die Spaltung des Spike-Proteins an mehr als einer Spaltstelle. Die für die unbehandelten und total deglykosylierten Spaltprodukte identifizierten Proteinbanden haben die Größe der Fragmente nach Spaltung an Aminosäureposition 463 (Spaltmotiv1), 667 (Bergeron et al., 2004) und 796 (Spaltmotiv2) (Abb. 11 und 14). Die Spaltfragmente für die Spaltung an Aminosäureposition 761 (Xiao et al., 2003) wurden weder unbehandelt und deglykosyliert detektiert (Abb. 11 und 14). Auf Grund der in dieser Arbeit erhalten Ergebnisse wurde die Spaltung an AS-Position 761 widerlegt.

Durch die Mausmonoklonalen Antikörper (Gubbins et al., 2005) konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass das Spike-Protein in infizierten Vero-Zellen und im solitären Expressionssystem mindestens zweimal gespalten wird. Der verwendete Antikörper bindet an einem Epitop im C-terminalen Bereich des Spike-Proteins (Gubbins et.al, 2005) und ist in der Lage drei Spike-Protein Banden im Immunoblot zu detektieren. Neben dem ungespaltenen S0 sind dies die zwei C-terminalen Spike-Proteinuntereinheiten S4 u. S5 (Abb 19). Diese Spaltprodukte entstehen nach Spaltung des Spike-Proteins an Aminosäureposition 463 und 667 (Abb. 9). Für das Respiratorische Synzytial Virus (RSV) wurde gezeigt, dass das F-Protein an zwei Spaltmotiven des Typs R-X-(K/R)-R durch Furin gespalten wird (Zimmer et al., 2001). Erst nach der Spaltung liegt das Fusions-Protein (F) in seiner aktiven Form bestehend aus F1 und F2 vor. Ein 29kDa großes Spaltprodukt, entsteht, welches den Bereich zwischen den beiden Spaltstellen an Aminosäureposition R109 und R136 umfasst. Bei der Infektion mit HIV-1 spielt das Glykoprotein gp120 eine wichtige Rolle bei der Bindung des Virus an den CD4 Rezeptors. Diese Bindung erfolgt erst nach Prozessierung des gp120 in zwei Proteinspezies der Größe 70 und

60kDa. Für diese Zweifachspaltung zur Aktivierung des gp120 ist die Trypsin2 (TL2) verantwortlich (Kido et al., 1999). Die möglichen Funktionen der Zwei- oder Mehrfachspaltung des SARS CoV Spike-Proteins und die Herausgespaltenen Peptidfragmente müssen noch weiter untersucht werden.

## **6.2 Prozessierung des Spike-Proteins durch zelluläre Proteasen**

Virale Glykoproteine können entweder in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten, an der Zelloberfläche oder in dem Zell umgebenden Medium aktiviert werden. Einige Glykoproteinevorläufer werden während ihres Transports auf dem sekretorischen Weg durch intrazelluläre Proteasen proteolytisch prozessiert. Das Lassavirus Glykoprotein GP-C z.B. wird im ER durch die Subtilisin-Protease SKI-1/S1P C-terminal am Spaltmotiv RRLL gespalten (Lenz et al., 2001). SKI-1/S1 ist auch für die Aktivierung des Glykoproteins des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) verantwortlich, wobei diese erst im späten Golgi-Apparat erfolgt (Beyer et al., 2003). Für andere Glykoproteine, wie das Masernvirus (MV) F-Protein, das gp160 des Humanen Immundefizienzvirus (HIV) oder das Hämagglutinin (HA) aviärer Influenzaviren, konnte gezeigt werden, dass die Spaltung durch das ubiquitär exprimierte Furin oder ein anderes Mitglied der Familie der Proteinkonvertasen vermittelt wird. Die Substrate werden C-terminal eines multibasischen Motivs, zumeist der Form R-X-K/R-R, im trans-Golgi oder dem trans-Golgi-Netzwerk gespalten (Hallenberger et al., 1992; Klenk und Garten, 1994; Watanbe et al., 1995). Dagegen werden z.B. das HA von Influenzaviren der Subtypen H1, H2 und H3 oder das Sendai Virus F-Protein C-terminal von einer einzelnen basischen Aminosäure prozessiert. Hier erfolgt die Aktivierung erst nach Erreichen der Zelloberfläche durch Trypsin-ähnliche Proteasen (TLPs),

wie z.B. Tryptase Clara, Plasmin oder HAT (*human airway trypsin-like protease*) (Böttcher et al., 2006; Kido et al., 1999; Klenk und Garten, 1994; Tashiro et al., 1992; Yasuoka et al., 1997). Die zelluläre Aktivierungsprotease ist neben dem Rezeptor eine weitere wichtige Determinante, die das Wirtsspektrum, den Gewebetropismus und die Pathogenität des Virus entscheidend beeinflussen kann (Klenk und Garten, 1994; Maisner et al., 2000). Es ist bekannt, dass die proteolytische Aktivierung von Fusions-vermittelnden viralen Proteinen unabdingbare Voraussetzung für die Virusinfektiosität ist.

Für das SARS CoV Spike-Protein wird Cathepsin L als Aktivierungsprotease postuliert, da die Inhibition dieser ubiquitär exprimierten Cysteinprotease zu einer Blockierung der SARS CoV Infektion führt (Simmons et al., 2005).

In einer *in-vitro* Fluoreszenzpeptidanalyse wurden die Spaltmotive und die zugehörigen Aktivierungsproteasen für das aviäre Influenzavirus Hong Kong (HKV), das Ebolavirus (EBV) und das Respiratorische Synzytial Virus (RSV) charakterisiert (Basak et al., 2001). Eine *in-vitro* Analyse der drei potentiellen Spaltmotive des SARS CoV Spike-Proteins hinsichtlich der für die Prozessierung verantwortlichen Protease zeigt, dass nur die Spaltmotive an Aminosäureposition 463 und 796 von Cathepsin L gespalten wurden. Alle drei Spaltstellen Aminosäureposition 463, 667 und 796 werden durch Trypsin gespalten. Die Spaltung des Spike-Proteins des SARS CoV durch Trypsin nach *in-vitro* Translation konnte schon früher gezeigt werden (Diplomarbeit Kursawe, 2004).

*In-vivo* konnte die Cathepsin L Spaltung des Spike-Proteins bis zu diesem Zeitpunkt nicht gezeigt werden. Die Nachspaltung von transient, solitär exprimiertem sowie in VSV  $\Delta$ G eingebautem Spike-Protein durch Cathepsin L ist nicht gelungen. Dafür zeigte die Untersuchung der proteolytischen SARS CoV Spike-Protein Spaltung *in-vivo* erstmals, dass das Spike-Protein durch die Proteasen Trypsin und HAT gespalten wird. Die Spaltfragmente waren identisch mit den aus SARS CoV infizierten Vero-Zellen. Die entstandenen Spaltprodukte deuten darauf hin, dass

Spaltung höchst wahrscheinlich an Aminosäureposition 463 und 667 nach einem basischen Argininrest stattfand. Die Proteasen TRMPSS2, Cathepsin B und L zeigen *in-vivo* keine Spaltung. Diese Daten machen HAT zu einem Kandidaten für die Aktivierungsprotease des SARS CoV Spike-Proteins.

### **6.3 Einfluss der Prozessierung des Spike-Proteins auf die Zell-Zell-Fusion**

Bei umhüllten Viren mit Klasse I-Fusionsproteinen muss eine Konformationsänderung des viralen Glykoproteins stattfinden, um den Fusionsprozess von Virushülle mit zellulärer Membran einzuleiten. Diese Änderung kann durch die Bindung des Glykoproteins an dem zellulären Rezeptor hervorgerufen werden. Dies gilt für die pH-unabhängige Fusion an der Plasmamembran, welche z.B. bei Paramyxoviren stattfindet. Hier wird das F-Protein entweder intrazellulär durch Furin, oder auf der Zelloberfläche durch Trypsin-ähnliche Proteasen gespalten (Earp et al., 2005). Eine weitere Strategie ist pH-abhängige Fusion. Diese ist für Orthomyxoviren, für Ebolaviren und SARS CoV beschrieben. Sie verlangt nach Rezeptorvermittelter Endozytose des Viruspartikels eine pH-abhängige Konformationsänderung der Glykoproteine. Erst dadurch werden die viralen Glykoproteine vollständig fusionskompetent und können die Fusion der Virusmembran mit der Endosomenmembran auch noch nach Viruseintritt vermitteln (Chandran et al., 2005; Simmons et al., 2005). Ein ähnlicher Mechanismus wird möglicherweise von einem humanen Influenzavirus (H1N1), dessen HA-Spaltung von einer Trypsin ähnlichen Protease abhängig ist genutzt, da es einige Zelltypen auch in Abwesenheit von exogenen Proteasen produktiv infizieren kann (Boycott et al.; 1994). Bei den Coronaviren ist bekannt, dass verschiedene Mitglieder einer Virusfamilie unterschiedliche Wege für die Spaltung des

viralen Fusionsproteins und den Viruseintritt in die Zelle nutzen können. Das Maus Hepatitis-Virus (MHV-2) und das SARS CoV benötigen für die Aufnahmen über Endozytose und anschließende Proteolyse Cathepsine (Qui et al., 2006, Simmons et al., 2005), während für die Infektion das aviäre infektiöse Bronchitis Virus lediglich einen sauren pH erforderlich ist (Chu et al., 2006). Nach neueren Untersuchungen kommt es beim Viruseintritt von SARS CoV in die Wirtszelle zum Clathrin vermittelter Endozytose (Inoue et al., 2007). Dagegen können der MHV-A59 Stamm oder das humane CoV NL63 die Zelle durch pH-unabhängige Fusion an der Plasmamembran infizieren (Huang et al., 2006; Qui et al., 2006). Darüber hinaus wurde für das MHV A59 gezeigt, dass die Inhibition der Spike-Protein Spaltung durch einen Furin-Peptidinhibitor die Zell-Zell-Fusion inhibiert, aber keinen Einfluss auf die Virus-Zell-Fusion hat. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass die Prozesse zwei unterschiedliche Anforderungen an das Spike-Protein stellen (de Haan et al., 2004). Beim SARS CoV verhält es sich anders. Hier erhöht die Furinspaltung des Spike-Proteins die Zell-Zell-Fusion, aber hat keinen Einfluss auf die Virus-Zell-Fusion (Follis et al., 2006). Dies verdeutlicht die Komplexität des Viruseintritts in die Zielzelle bei Coronaviren.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für Fusion ist die Rezeptorverteilung auf der Zielzelle. Für SARS CoV wurde „*angiotensin converting enzyme 2*“ (ACE2) als Rezeptor identifiziert (Li et al., 2005). ACE2 ist eine Carboxypeptidase, die für die Umwandlung von Angiotensin verantwortlich ist. Hauptsächlich wird diese Exopeptidase in den Endothelzellen der Gefäße des Herzens und der Niere gebildet. Sie kommt aber auch in der Lunge, dem Magen und der Leber vor (Prabakaran et al., 2004).

Der heterologe Zell-Zell-Fusionstest zeigt, dass sowohl ACE2 als auch SARS CoV Spike-Protein für die Fusion benötigt werden. Die Fusion findet in diesem System pH-unabhängig statt. Dies deutet daraufhin, dass die Fusion des SARS CoV ähnlich ablaufen könnte, wie die des Aviären Leukose-Virus (ALV). Das ALV vereint die beiden Mechanismen der pH-abhängigen und pH-unabhängigen Fusion. Die Virusbindung an den

Rezeptor induziert eine pH-unabhängige Konformationsänderung im Fusionsprotein, die das Protein sensitiv für die nachfolgende pH-abhängig Fusion im endosomalen Kompartiment macht (Barnard et al., 2004). Eine andere Möglichkeit für die erhaltene pH-unabhängige Fusion ist, dass das SARS CoV neben dem ACE2 noch einen anderen Rezeptor oder einen Co-Rezeptor für die Fusion nutzt. Für das HIV-1 sind neben dem CD4-Protein auf T-Lymphozyten auch noch andere Proteine als Co-Rezeptor identifiziert worden. Hierzu zählen der Chemokin-Rezeptor CCR5 an monozytären Zellen und CXCR4 Rezeptoren an T-Zellen (Dragic et al., 1996; Zou et al., 1998).

## 6.4 Inhibition der Fusion

Um die Inhibition der Infektion des SARS CoV zu untersuchen, wurden Peptide benutzt die gegen, die „*heptad repeats*“ HR1 und HR2 Region und den Loop zwischen den zwei HR Bereichen gerichtet waren (Yuan et al., 2004; Sainz Jr. et al, 2006). Die *in vitro* Untersuchung der Spaltstelle des Lassa Virus Glykoproteins hat ergeben, dass die Spaltung durch Oligopeptide die gegen das Spaltmotiv gerichtet sind irreversible inhibiert wird (Pasquato et al., 2006). Für das Haus Hepatitis Virus ist gezeigt, dass die Inhibition der Furinspaltung des Glykoproteins durch Peptide die Zell-Zell-Fusion inhibiert (de Hann et al., 2004) Die Spaltung der SARS CoV Spike-Proteins mittels Furin zeigt eine Verstärkung der Zell-Zell-Fusion (Follis et al., 2006) Die in dieser Arbeit durchgeführte *in vivo* Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von Oligopeptiden (Abb. 23), die gegen die SARS CoV Spike-Protein Spaltmotive (Abb. 35) gerichtet waren hat keinen Effekt auf die Zell-Zell-Fusion ergeben. Das lässt darauf schließen, dass die Spaltung keinen Einfluss auf die Zell-Zell-Fusion hat.



## 6.5 Einfluss der Prozessierung des Spike-Proteins auf die Infektion

Aufgrund der hohen Infektionsrate und Mortalität bestimmter human pathogener Viren, wie z.B. dem SARS CoV und Ebola Virus, wurde diese in die Biologische Sicherheitsstufe 3 bzw. 4 (BSL3 bzw. BLS4) eingestuft. Um Funktionsstudien an Glykoproteinen dieser Viren unter geringeren Sicherheitsbedingungen durchführen zu können, wurde ein replikationsdefizientes rekombinantes Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV)  $\Delta$ G hergestellt. Dieses Glykoprotein defiziente Virus ist in der Lage nach Infektion von Zellen, Glykoproteine von anderen Viren als fremde Glykoproteine in die Virushülle der Nachkommenviren zu inkorporieren. Das VSV  $\Delta$ G System wurde für die Untersuchungen des Ebola Virus Reston Glykoproteins genutzt (Takada et al., 1997) und konnte in der Folge auch für das Influenzavirus C Glykoprotein erfolgreich verwendet werden (Hanika et al., 2005). Für das SARS CoV wurde mit dem VSV  $\Delta$ G die Infektion an der apikalen Seite von polar wachsenden „colon carcinoma Zellen“ (Caco2), „lung carcinoma zellen (Calu-3) und Vero-Zellen gezeigt (Ren et. al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die VSV  $\Delta$ G Spike-Protein Viren nur ungespaltenes Spike-Protein von SARS CoV auf der Oberfläche tragen, wenn dies in den VSV  $\Delta$ G infizierten Zellen exprimiert wird. Dieses ungespaltene Spike-Protein lässt sich durch Cathepsin L oder B nicht spalten. Nur nach Zugabe von exogenem Trypsin erfolgt eine Spaltung des Spike-Proteins des SARS CoV im VSV  $\Delta$ G, die identisch ist mit der des Spike Proteins in SARS CoV infizierten Vero-Zellen. Diese Nachspaltung des Spike-Proteins hat keine Erhöhung der Infektionsrate zur Folge. Der gleiche Effekt wurde für die Furinspaltung des Spike-Proteins des SARS CoV und des Maus Hepatitis Virus beschrieben. Auch diese Spaltung hat keinen Einfluss auf die Aufnahme des Virus in die Zelle (Follis et al., 2006; de Haan et al., 2004). Dies könnte durch notwendige Mehrfachspaltung des Spike-Proteins erklärt werden.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Für einige S-Proteine von Coronaviren ist eine proteolytische Spaltung in zwei Untereinheiten, S1 und S2, an einem multibasischen Spaltnotiv von der zellulären Endoprotease Furin nachgewiesen. Ob diese Spaltung essentiell für die Funktion des S-Proteins ist, wird kontrovers diskutiert. Neueren Daten zufolge, ist die Spaltung des S-Proteins für die Zell-Zell Fusion essentiell. Für die Fusion der Virushülle mit der Membran der Zielzelle ist die Bedeutung der Spaltung nicht gezeigt.

Die Ziele dieser Arbeit waren (i) die Charakterisierung des S-Proteins, (ii) die Untersuchung der proteolytischen Spaltung, (iii) die Herstellung von S-Protein spezifischen Antikörpern zur Untersuchung des Spaltstellen und (iv) die Identifizierung der verantwortlichen zellulären Proteasen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit ist es gelungen Antikörper gegen das SARS-CoV S-Protein und seine Untereinheiten herzustellen und immunochemisch zu charakterisieren. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das S-Protein mindestens an drei unterschiedlichen Erkennungssequenzen für zelluläre Proteasen gespalten wird. Diese Spaltnotive liegen auf dem S-Protein an Aminosäureposition 451-463, 667 und 797. Ein Viertes in der Literatur diskutiertes Spaltnotiv an Aminosäureposition 761 konnte anhand der erhaltenen Daten ausgeschlossen werden. Fluoreszierende Peptide aus den Sequenzbereichen der postulierten Spaltstellen konnten mit den Proteasen Cathepsin L und Trypsin gespalten werden.

Ein solitäres Expressionssystem für das S-Protein konnte hergestellt werden und mit diesem wurde ein Zell-Zell-Fusionsassay etabliert. In diesem System konnte kein Einfluss der Spaltungen auf die Zell-Zell-Fusion festgestellt werden.

Das S-Protein konnte in das VSV  $\Delta G$  System eingebaut, identifiziert und durch Trypsin nachgespalten werden. Die Nachspaltung hat hier keine Erhöhung der Infektionsrate zur Folge.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass das SARS CoV S-Protein durch die Serinprotease HAT (*human trypsin-like protease*) gespalten wird. Die Spaltung resultiert in Spaltfragmenten gleicher Größe wie bei Trypsinspaltung des S-Protein.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Authier F., Posner B.I., Bergeron J.J. (1996); Endosomal proteolysis of internalized proteins; FEBS Lett, 389, 55-60

Avendano M., Derkach P., Swan S. (2003); Clinical course and management of SARS in health care workers in Toronto; a case series; CMAJ. 168, Issue 13

Barnard R.J., Narayan S., Dornadula G., Miller M.D., Young J.A. (2004); Low pH is required for avian sarcoma and leukosis virus Env-dependent viral penetration into the cytosol and not for viral uncoating; J Virol, 78, 10433-10441

Barrett A.J. (1994); Classification of peptidases; Methods Enzymol, 244, 1-15

Basak A., Zhong M., Munzer JS, Chretien M, Seidah NG. (2001); Implication of the proprotein convertases furin, PC5 and PC7 in the cleavage of surface glycoproteins of Hong Kong, Ebola and respiratory syncytial viruses: a comparative analysis with fluorogenic peptides.; Biochem J., 353, 537-45

Bergeron E., Vincent M.J., Wickham L., Hamelin J., Basak A., Nichol S.T., Chrétien M., Seidah N.G. (2004); Implication of proprotein convertases in the processing and spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus; Biochemical and Biophysical Research Communication, 326, 554-563

Beyer W.R., P pplau D., Garten W., von Laer D., Lenz O. (2003); Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by subtilase SKI-1/S1P; J Virol, 77, 2866-2872

Bidere N., Lorenzo H.K., Carmona S., Laforge M., Harper F., Dumont C., Senik A. (2003); Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-including factor (AFI) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis; J Biol Chem, 278, 31401-31411

Birnboim H.C. and Doly J. (1979); A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA; Nucleic Acids Res. 24, 1513-23

Bohley P. and Seglen P.O. (1992); Proteases and proteolysis in the lysosome; Experientia, 48, 151-157

Booth C.M., Matukas L.M., Tomlinson G.A., (2003); Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area; JAMA. 289, 2801-9

Bos E.C.W., Luytjes W., Spaan W.J. (1997); The function of the spike protein of mouse hepatitis virus strain A59 can be studied on virus-like particles: cleavage is not required for infectivity; J Virol. 71, 9427-9433.

Bos E.C.W., Heijnen L., Luytjes W., Spaan W.J.M. (1995); Mutational Analysis of the Murine Coronavirus Spike-Protein: Effects on Cell-to-Cell Fusion; Virol, 214, 453-463

Boycott R, Klenk HD, Ohuchi M. (1994); Cell tropism of influenza virus mediated by hemagglutinin activation at the stage of virus entry; Virology. 203, 313-9

Böttcher E, Matrosovich T, Beyerle M, Klenk HD, Garten W, Matrosovich M (2006); Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium; J Virol., **80**, 9896-8

Chandran K., Sullivan N.J., Felbor U., Whelan S.P., Cunningham J.M. (2005); Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection; Science, 308, 1643-1645

Chu V.C., McElroy L.J., Chu V., Bauman B.E., Whittaker G.R. (2006); The avian coronavirus infectious bronchitis virus undergoes direct low.pH-dependent fusion activation during entry into host cells; J Virol, 80, 3180-3188

Chung C.T., Nielmela S.L., Miller R.H. (1998); One Stepp preparation of competent Escherichia coli: tranformation and storage of bacterial cells in the same solution; Proc Natl Acad Sci USA, 86, 2172-2175

Day R., Lazure C., Basak A., Boudreault A., Limperis P., Dong W., Lindberg I. (1998); Prodynorphin processing by proprotein convertase 2. Cleavage at single basic residues and enhanced processing in the presence of carboxypeptidase activity; J Biol Chem. 273, 829-36.

Dimitrov D.S. (1997); How Do Viruses Enter Cells? The HIV Coreceptors Teach Us a Lesson of Complexity; Cell, 91, 721-730

Dragic T., Litwin V., Allaway G.P., Martin S.R., Huang Y., Nagashima K.A., Cayanan C., Maddon P.J., Koup R.A., Moore J.P., Paxton W.A. (1996); HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5; Nature, 381, 667-73

Drosten C., Gunther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt HR., Becker S., Rabenau H., Panning M., Kolesnikova L., Fouchier RA., Berger A., Burguiere A.M., Cinatl J., Eickmann M., Escriou N., Grywna K., Kramme S., Manuguerra J.C., Müller S., Rickerts V., Stürmer M., Vieth S., Klenk H-D., Osterhaus A.D., Schmitz H., Doerr H-W. (2003); Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome; N. Engl. J. Med. 348(20), 1967-76

Earp L.J., Delos S.E., Park H.E., White J.M. (2005); The many mechanisms of viral membrane fusion proteins; Curr Top Microbiol Immunol, 285, 25-66

Eickmann M., Becker S., Klenk H.D., Doerr H.W., Stadler K., Censini S., Guidotti S., Masignani V., Scarselli M., Mora M., Donati C., Han J.H., Song H.C., Abrignani S., Covacci A., Rappuoli R. (2003); Phylogeny of the SARS coronavirus; Science, 302(5650), 1504-1505

Follis KE, York J, Nunberg JH. (2006); Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry; Virol, 350, 358-69

Fouchier R. A. M., Kuiken T., Schutten M., van Amerongen G., van Doornum G.J.J., van den Hoogen B.G., Peiris M., Lim W., Stöhr K., Osterhaus A.D.M.E. (2003); Koch's postulates fulfilled for SARS virus; Nature 423, 240

Gorbalenya A.E., Enjuanes L., Ziebuhr J., Snijder E.J. (2006); *Nidovirales*: Evolving the largest RNA virus genome; Virus Research 117, 17-37

Guan Y., Zheng B.J., He Y.Q., Liu X.L., Zhuang Z.X., Cheung C.L., Luo S.W., Li P.H., Ghang L.J., Guan Y.J., Butt K.M., Wong K.L., Chan K.W., Lim W., Shortridge K.F., Yuen K.Y., Peiris J.S., Poon L.L. (2003); Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China; Science 302(5643), 276-8

Guan Y., Peiris J.S., Zheng B., Poon L.L., Chan K.H., Zeng F.Y., Chan C.W., Chan M.N., Chen J.D., Chow K.Y., Hon C.C., Hui K.H., Li J., Li V.Y., Wang Y., Leung S.W., Yuen K.Y., Leung F.C. (2004); Molecular epidemiology of the novel coronavirus that causes severe acute respiratory syndrome; Lancet 363, 99-104

Gubbins MJ, Plummer FA, Yuan XY, Johnstone D, Drebot M, Andonova M, Andonov A, Berry JD. (2005); Molecular characterization of a panel of murine monoclonal antibodies specific for the SARS-coronavirus; Mol Immunol., 42, 125-36

de Haan CA, Stadler K, Godeke GJ, Bosch BJ, Rottier PJ. (2004); Cleavage inhibition of the murine coronavirus spike protein by a furin-like enzyme affects cell-cell but not virus-cell fusion; *J Virol.*, 78, 6048-54

Hallenberger S., Bosch V., Angliker H., Shaw E., Klenk H.D., Garten W. (1992); Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160; *Nature*, 360, 358-361

Hanika A., Larisch B., Steinmann E., Schwegmann-Weßels C., Herrler G., Zimmer G. (2005); Use of influenza C virus glycoprotein HEF for generation of vesicular stomatitis virus pseudotypes

Higuchi R., Kummel B., Saiki R.K. (1988); A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DANN interactions; *Nucleic Acids Res*, 16, 7351-7367

Hofmann H., Krzysztof P., van der Hoek L., Geier M., Berkhout B., Pöhlmann S., (2005); Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry; *PNAS* 102(22), 7988-7993

Holmes K.V., (2003); SARS-Assoziates Coronavirus; *N Engl J Med* 348(20), 2003, 194

Holmes K.V., (2003); SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy; *Journal of Clinical Investigation* 111(11), 1605-1609

Honey K. and Rudensky A.Y. (2003); Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation; *Nat Rev Immunol*, 3, 472-482

Huang I.C., Bosch B.J., Li F., Li W., Lee K.H., Ghiran S., Vasilieva N., Dermody T.S., Harrison S.C., Dormitzer P.R., Farzan M., Rottier P.J., Choe H. (2006); SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells; *J Biol Chem.*, **281**, 3198-203

Inoue Y., Tanaka N., Tanaka Y., Inoue S., Morita K., Zhuang M., Hattori T., Sugamura K. (2007); Clathrin-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into target cells expressing ACE2 with the cytoplasmic tail deleted; *J Virol.*, **81**, 8722-9.

Jackwood M.W., Hilt D.A., Callison S.A., Lee C.W., Plaza H., Wade E. (2001); Spike glycoprotein cleavage recognition site analysis of infectious bronchitis virus; *Avian Dis.*(45):366-732.

Keng C.T., Zhang C.T., Shen S., Lip K.M., Fielding B.C., Tan T.H., Chou C.F., Loh C.B., Wang S., Fu J., Yang X., Lim S.G., Hong W., Tan Y.J., (2005); Amino acids 1055 to 1192 in the S2 region of severe acute respiratory syndrome coronavirus S protein induce neutralizing antibodies: implications for the development of vaccines and antiviral agents; *J Virol.* 79(6):3289-96.

Kido H., Murakami M., Oba K., Chen Y., Towatari T. (1999); Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses; *Mol Cells*, 9, 235-244

Klenk H.D. and Garten W. (1994); Host cell protease controlling virus pathogenicity; *Trends Microbiol*, 2, 39-43

Krischke H. and Barrett A.J. (1987); Chemistry of lysosomal proteases. In *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown* (Glauman H. And Ballard F.J. eds); Academic Press, New York, pp 193-238

Krokhin O., Li Y., Andonov A., Feldmann H., Flick R., Jones S., Stroehrer U., Bastien N., Dasuri K.V., Cheng K., Simonsen J.N., Perreault H., Wilkins J., Ens W., Plummer F., Standing K.G. (2003); Mass Spectrometric Characterization of Proteins from the SARS Virus: A Preliminary Report; *Mol Cell Proteomics*. 2,346-56

Ksiazek T.G., Erdmann D., Goldsmith C.S., Zaki S.R., Peret T., Emery S., Tong S., Urbani C., Comer J.A., Lim W., Rollin P.E., Dowell S.F., Ling A.E., Humphrey C.D., Shieh W.J., Guanar J., Paddock C.D., Rota P., Fielda B., DeRisi J., Yang J.Y., Cox N., Hughes J.M., LeDuc J.W., Bellini W.J., Anderson L.J.; SARS Working Group. (2003); A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome; *N Engl J Med*. 15; 348(20):1953-66

Kuiken T., Fouchier R.A., Schutten M., Rimmelzwaan G.F., van Amerongen G., van Riel D., Laman J.D., de Jong T., van Doornum G., Lim W., Ling A.E., Chan P.K., Tam J.S., Zambon M.C., Gopal R., Drosten C., van der Werf S., Escriou N., Manuguerra J.C., Stohr K., Peiris J.S., Osterhaus A.D., (2003); Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome; *Lancet.*, 362(9380):263-70.

Kyhse-Andersen J. (1984); Elektrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose; *J Biochem Biophys Methods*. 10, 203-209

Laemmli U.K. (1970); Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature*, 227, 680-685

Lai M.M., Cavanagh D. (1997); The molecular biology of coronaviruses; *Adv Virus Res.* 48, 1-100



Lazure C., Gauthier D., Jean F., Boudreault A., Seidah N.G. Bennett H.P., Hendy G.N. (1998); In vitro cleavage of internally quenched fluorogenic human parathyroid hormone and parathyroid-related peptide substrates by furin. Generation of potent inhibitor; J Biol Chem, 273, 8572-8580

Lee N., Hui D., Wu A., Chan P., Cameron P., Joynt G.M., Ahuja A., Yung M.Y., Leung C.B., To K.F., Lui S.F., Szeto C.C., Chung S., Sung J.J. (2003); A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong; N. Engl. J. Med. 348(20), 1986-94

Lenz O., ter Meulen J., Klenk H.D., Seidah N.G., Garten W. (2001); The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P; Proc Natl Acad Sci USA, 98, 12701-12705

Li F., Li W., Farzan M., Harrison S.C., (2005); Structure of SARS Coronavirus Spike receptor-binding domain complexed with receptor; Science 309, 1864-1868

Maisner A., Mrkic B., Herrler G., Moll M., Billeter M.A., Cattaneo R., Klenk H.D. (2000); Recombinant measles virus requiring an exogenous protease for activation of infectivity; J Gen Virol, 81, 441-449

Marra M.A., Jones S.J., Astell C.R., Holt R.A., Brooks-Wilson A., Butterfield Y.S., Khattra J., Asano J.K., Barber S.A., Chan S.Y., Cloutier A., Coughlin S.M., Freeman D., Girn N., Griffith O.L., Leach S.R., Mayo M., McDonald H., Montgomery S.B., Pandoh P.K., Petrescu A.S., Robertson A.G., Schein J.E., Siddiqui A., Smailus D.E., Stott J.M., Yang G.S., Plummer F., Andonov A., Artsob H., Bastien N., Bernard K., Booth T.F., Bowness D., Czub M., Drebot M., Fernando L., Flick R., Garbutt M., Gray M., Grolla A., Jones S., Feldmann H., Meyers A., Kabani A., Li Y., Normand S., Stroher U., Tipples G.A., Tyler S., Vogrig R., Ward D., Watson B., Brunham R.C., Kraiden M., Petric M., Skowronski D.M., Upton C., Roper R.L. (2003); The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus; Science 300, 1399-404

McGrath M.E. (1999); The lysosomal cysteine proteases; Annu Rev Biochem Biomol Struct, 28, 181-204

Mullis K.B., Faloona F.A. (1987); Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction; Methods Enzymol. 155, 335-50

Nagai Y. and Klenk H.D. (1977); Activation of precursors to both glycoproteins of Newcastle disease virus by proteolytic cleavage; Virology, 77, 125-134

Nie Y., Wang P., Shi X., Wang G., Chen J., Zheng A., Wang W., Wang Z., Qu X., Luo M., Tan L., Song X., Yin X., Chen J., Ding M. und Deng H. (2004); Highly infectious SARS-CoV pseudotyped virus reveals the cell tropism and its correlation with receptor expression; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321, 994-1000

Pager C.T., Craft W.W. Jr., Patch J., Dutch R.E. (2006); A mature and fusogenic form of Nipah virus fusion protein requires proteolytic processing by cathepsin L; *Virology*, 346, 251-257

Pager C.T., Wurth M.A., Dutch R.E. (2004); Subcellular localization and calcium and pH requirements for proteolytic processing of the Hendra virus fusion protein; *J Virol*, 78, 9154-9163

Pasquato A., Pullikotil P., Asselin M.C., Vacatello M., Paolillo L., Ghezzi F., Basso F., Di Bello C., Dettin M., Seidah N.G. (2006); The proprotein convertase SKI-1/S1P. In vitro analysis of Lassa virus glycoprotein-derived substrates and ex vivo validation of irreversible peptide inhibitors; *J Biol Chem.*, 281, 23471-81

Peiris J.S., Lai S.T., Poon L.L., Guan Y., Yam L.Y., Lim W., Nicholls J., Yee W.K., Yan W.W., Cheung M.T., Cheng V.C., Chan K.H., Tsang D.N., Yung R.W., Ng T.K., Yuen K.Y.; SARS study group. (2003); Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome; *Lancet* 361, 1319-25

Peiris J.S., Chu C.M., Cheng V.C., Chan K.S., Hung I.F., Poon L.L., Law K.I., Tang B.S., Hon T.Y., Chan C.S., Chan K.H., Ng J.S., Zheng B.J., Ng W.L., Lai R.W., Guan Y., Yuen K.Y.; HKU/UCH SARS Study Group. (2003); Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study; *Lancet* 361, 1767-72

Peiris J.S.M., Guan Y. Und Yuen K.Y. (2004); Severe acute respiratory syndrome; *Nature medicine* 10(12), 88-97

Petit C.M., Melancon J.M., Chouljenko V.N., Colgrove R., Farzan M., Knipe D.M., Kousoulas K.G. (2005); Genetic analysis of the SARS-coronavirus spike glycoprotein functional domains involved in cell-surface expression and cell-to-cell fusion; *Virology*, **341**, 215-30.

Poon L.L.M., Chu D.K.W., Chan K.H., Wong O.K., Ellis T.M., Leung Y.H.C., Lau S.K.P., Woo P.C.Y., Suen K.Y., Yuen K.Y., Guan Y., Peiris J.S.M. (2004); Identification of a novel coronavirus in Bats; *Journal of Virology* 79(4), 2001-2009

Prabakaran P., Xiao X., Dimitrov D.S. (2004); A model of ACE2 structure and function as a SARS-Cov receptor; *Biochem Biophys Res Commun* 314, 235-241

Rawlings N.D. and Barrett A.J. (2000); MEROPS: the peptidase database; *Nucleic Acids Res*, 28, 323-325

Qui Z., Hingley S.T., Simmons G., Yu C., Das Sarma J., Bates P., Weiss S.R. (2006); Endosomal proteolysis by cathepsins is necessary for murine coronavirus mouse hepatitis virus type 2 spike-mediated entry; *J Virol*, 80, 5768-5776

Reinheckel T., Deussing J., Roth E., Peters C. (2001); Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L; *Bio Chem*, 382, 735-741

Ren X., Glende J., Al-Falah M., de Vries V., Schwegmann-Weßels C., Qu X., Tan L., Tschernig T., Deng H., Naim H.Y., Herrler G. (2006); Analysis of ACE2 in polarized epithelial cells: surface expression and function as rezeptor for severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus; *J of Gen Virol*, 87, 1691-1695

Rota P.A., Oberste M.S., Monroe S.S., Nix W.A., Campagnoli R., Icenogle J.P., Penaranda S., Bankamp B., Maher K., Chen M.H., Tong S., Tamin A., Lowe L., Frace M., DeRisi J.L., Chen Q., Wang D., Erdman D.D., Peret T.C., Burns C., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Sanchez A., Liffick S., Holloway B., Limor J., McCaustland K., Olsen-Rasmussen M., Fouchier R., Gunther S., Osterhaus A.D., Drosten C., Pallansch M.A., Anderson L.J., Bellini W.J. (2003); Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome; *Science* 300(5624), 1394-9

Sainz B. Jr., Mossel E.C., Gallaher W.R., Wimley W.C., Peters C.J., Wilson R.B., Garry R.F. (2006); Inhibition of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) infectivity by peptides analogous to the viral spike protein; *Virus Res.*, 120, 146-55.

Sainz B. Jr., Rausch J.M., Gallaher W.R., Garry R.F., Wimley W.C. (2005); Identification and characterization of the putative fusion peptide of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus spike protein; *J Virol.*, 79, 7195-206.

Sambrook J., Fritsch E. und Maniatis T. (1989); *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977); DNA sequencing with chain-terminating inhibitors; *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-7

Schmitz H. und Drosten C. (2004); Die Bedeutung von Coronaviren - Das Beispiel SARS; Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 2004(47),647-657

Simmons G., Reeves J.D., Rennekamp A.J., Amberg S.M., Piefer A.J., Bates P. (2004); Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry; Proc Natl Acad Sci U S A., **101**, 4240-5.

Simmons G., Gosalia D.N., Rennekamp A.J., Reeves J.D., Diamond S.L., Bates P. (2005); Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry; PNAS, Vol.102(33), 11876-11881

Snijder E.J., Bredenbeek P.J., Dobbe J.C., Thiel V., Ziebuhr J., Poon L.L.M., Guan Y., Rozanov M., Spaan W.J.M. und Gorbalenya A.E. (2003); Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the Coronavirus Group 2 lineage; J.Mol.Biol. 331, 991-1004

Song, H.C., Seo, M.Y., Stadler, K., Yoo, B.J., Choo, Q.L., Coates, S.R., Uematsu, Y., Harada, T., Greer, C.E., Polo, J.M., Pileri, P., Eickmann, M., Rappuoli, R., Abrignani, S., Houghton, M., Han, J.H. (2004); Synthesis and characterization of a native, oligomeric form of recombinant severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein; J. of Virology 78: 10328-10335

Stadler K., Massignani V., Eickmann M., Becker S., Abrignani S., Klenk H-D., Rappuoli R. (2003); SARS-Beginning to understand a new virus; Nature Reviews Mikrobiology 1(3), 209-18

Stauber R, Pfeleiderera M, Siddell S (1993); Proteolytic cleavage of the murine coronavirus surface glycoprotein is not required for fusion activity; J Gen Virol.74, 183-191

Sturman L.S., Holmes K.V. (1985); Proteolytic cleavage of peplomeric glycoprotein E2 of MHV yields two 90K subunits and activates cell fusion; Adv Exp Med Biol. 173, 25-35

Takada A., Robison C., Goto H., Sanchez A., Murti K.G., Whitt M.A., Kawaoka Y. (1997); A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein; Proc Natl Acad Sci USA, 94, 14764-14769

Tashiro M., Yokogoshi Y., Tobita K., Seto J.T., Rott R. Kido H. (1992); Trypsin Clara, an activating protease for Sendai virus in rat lungs, is involved in pneumopathogenicity; J Virol, 66, 7211-7216

Thiel V., Herold J., Schelle B., Siddell S.G. (2001); Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription; *J Virol.*, 75, 6676-81

Turk B., Turk D., Turk V. (2000); Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers; *Biochem Biophys Acta*, 1477, 98-111

Turk D. and Guncar G. (2003); Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets; *Acta Crystallogr D Bio Crystallogr*, 59, 203-213

Vogelstein B., Gillespie D. (1979); Preparative and analytical purification of DNA from agarose; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76, 615-9.

Watanabe M., Wang A., Sheng J. Gombart A.F., Ayata M., Ueda S., Hirano A., Wong T.C. (1995); Delayed activation of altered fusion glycoprotein in a chronic measles virus variant that causes subacute sclerosing panencephalitis; *J Neurovirol*, 1, 412-423

Wu X.D., Shang B., Yang R.F., Yu H., Ma Z.H., Shen X., Ji Y.Y., Lin Y., Wu Y.D., Lin G.M., Tian L., Gan X.Q., Yang S., Jiang W.H., Dai E.H., Wang X.Y., Jiang H.L., Xie Y.H., Zhu X.L., Pei G., Li L., Wu J.R., Sun B. (2004); The spike protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) is cleaved in virus infected Vero-E6 cells; *Cell Res.*, 14, 400-6.

Wong S.K., Li W., Moore M.J., Choe H., Farzan M. (2004); A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2; *J Biol Chem*. 279, 3197-201

Xiao X., Chakraborti S., Simitrov A.S., Gramatikoff K., Dimitrov D.S. (2003); The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterisation; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312, 1159-1164

Yang Z.Y., Huang Y., Ganesh L., Leung K., Kong W.P., Schwartz O., Subbarao K., Nabel G.J. (2004); pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN; *J Virol.*, **78**, 5642-50

Yamada YK, Takimoto K, Yabe M, Taguchi F (1998); Requirement of proteolytic cleavage of the murine coronavirus MHV-2 spike protein for fusion activity; *Adv Exp Med Biol*. 440, 89-93.

Yasuoka S., Ohnishi T., Kawano S., Tsuchihashi S., Ogawara M., Masuda K., Yamaoka K., Takahashi M., Sano T. (1997); Purification, characterization and localization of novel trypsin-like protease found in the human airway; *Am J Respir Cell Mol Biol*, 16, 300-308

Yuan K., Yi L., Chen J., Qu X., Qing T., Rao X., Jiang P., Hu J., Xiong Z., Nie Y., Shi X., Wang W., Ling C., Yin X., Fan K., Lai L., Ding M., Deng H. (2004); Suppression of SARS-CoV entry by peptides corresponding to heptad regions on spike glycoprotein; *Biochem Biophys Res Commun*, 319, 746-52

Zambon M., Nicholson K.G. (2003); Sudden acute respiratory syndrome; *BMJ*. 326; 669-670

Zhang H., Wang G., Li J., Nie Y., Shi X., Lian G., Wang W., Yin X., Zhao Y., Qu X., Ding M. und Deng H. (2004); Identification of an Antigenic Determinant on the S2 Domain of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Glycoprotein Capable of Inducing Neutralizing Antibodies; *J. of Virology* 78(13), 6938-6945

Ziebuhr J., Snijder E.J., Gorbalenya A.E. (2000); Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales; *J. Gen. Virol.* 81, 853-79

Zimmer G., Budz L., Herrler G. (2001); Proteolytic Activation of Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein; *Journal of Biological Chemistry* Vol. 276, Nr.34, 31642-31650

Zou Y.R., Kottmann A.H., Kuroda M., Taniuchi I., Littman D.R. (1998); Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development; *Nature*, 393, 595-9

## 9 ANHANG

### 9.1 Zusammenfassung der getesteten Antiseren

Antikörper	Ursprung	Spezifität	Immunfluoreszenz Oberflächenfärbung	Immunfluoreszenz Intrazelluläre Färbung	Immunoblot Färbung
$\alpha$ SARS CoV	inaktiviertes Virus	S, N, M	+++	+++	+++
$\alpha$ S1P	bakteriell	S1	++	++	++
$\alpha$ S2P	bakteriell	S2	+	+	++
$\alpha$ S6	Peptide	S	$\pm$	-	+
$\alpha$ S8L	Peptide	S	-	-	+
$\alpha$ S10	Peptide	S	-	-	+
$\alpha$ S1/S2	bakteriell	S	+	++	+++
$\alpha$ S1	bakteriell	S1	+++	+++	+++
$\alpha$ HR1	Peptide	S2	-	-	+
$\alpha$ HR2	Peptide	S2	-	-	+++
$\alpha$ F26G6	inaktiviertes Virus	S	+++	+++	+++
$\alpha$ F26G8	inaktiviertes Virus	S	+++	+++	+++
$\alpha$ F26G18	inaktiviertes Virus	S	++	++	++
$\alpha$ F26G19	inaktiviertes Virus	S	-	-	-

**Abb. 34: Zusammenfassung der Ergebnisse für die getesteten Antiseren**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Oberflächen-, Intrazellulären-Immunfluoreszenz und der Immunoblot Färbung.

Die positiv getesteten Antiseren sind grau hinterlegt.

Die plus und minus Zeichen stehen für die Detektion:

+++ = sehr gute

+ = schwache

- = keine

++ = gut

+/- = sehr schwach;

## 9.2 Übersicht welcher Antikörper welches S-Protein Spaltfragment detektiert

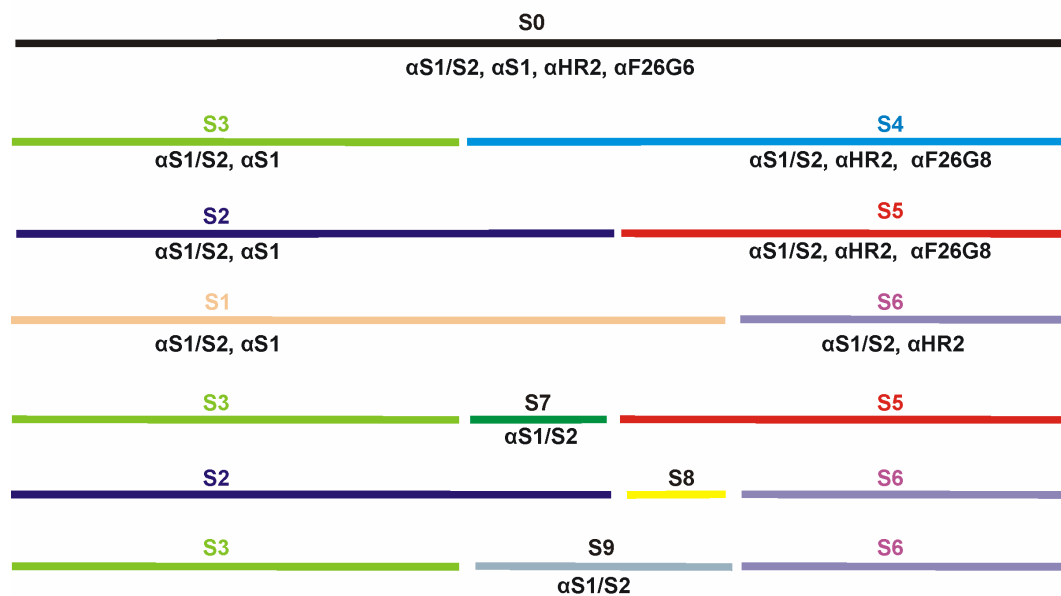


Abb. 35: Graphische Darstellung der in dieser Arbeit entdeckten der S-Proteinspaltprodukte und der Antikörper die Sie detektieren



## Abkürzungsverzeichnis

<b>α</b>	anti
Abb.	Abbildung
ACE2	Angiotensin Converting Enzyme 2
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<b>bp</b>	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<b>°C</b>	Grad Celsius
C	Cytosin
C-terminus	Carboxyterminus
<b>Da</b>	Dalton
DMEM	Dulbeccos' s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
def	defizient
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
<b>FKS</b>	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
<b>g</b>	Gramm
g	Gravitationskoeffizient
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	Stunde
HAT	“human airways trypsin-like protease“
HIV	“Human Immundeficiency Virus“
<b>IB</b>	Immunoblot
IF	Immunfluoreszenz
<b>K</b>	Kalium
kDa	Kilodalton
<b>l</b>	Liter
<b>m</b>	Milli-
M	Molar
M.O.I.	Multiplicity of Infection
<b>μ</b>	Mikro-

---

MG	Molekulargewicht
min	Minuten
m-RNA	Botenribonukleinsäure
<b>Na</b>	Natrium
NaAc	Natriumacetat
NC	Nitrozellulose
N-terminal	Aminoterminal
<b>OD</b>	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	potentia hydrogenii
PNGase F	Peptid-N4-(N-acetyl-β-Glukosaminy)Asparagin Aminase F
<b>RIPA</b>	Radio Immunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
<b>S-Protein</b>	Spike-Protein
sec	Sekunden
SARS	Schwere akute Atemnotssyndrom
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Signalpeptid
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
<b>T</b>	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembranprotein
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSS	Transformation and Storage Solution
TTP	Thymintriphosphat
ü.N.	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
ÜS	Überstand
UpM	Umdrehungen pro Minute
U	internationale Einheit
UV	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
w/v	Gewicht/Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wt	Wildtyp

**Abkürzungen der Aminosäuren**

<b>A</b>	Ala	Alanin
<b>C</b>	Cys	Cystein
<b>D</b>	Asp	Aspartat
<b>E</b>	Glu	Glutamat
<b>F</b>	Phe	Phenylalanin
<b>H</b>	His	Histidin
<b>G</b>	Gly	Glycin
<b>I</b>	Ile	Isoleucin
<b>K</b>	Lys	Lysin
<b>L</b>	Leu	Leucin
<b>M</b>	Met	Methionin
<b>N</b>	Asp	Asparagin
<b>P</b>	Pro	Prolin
<b>Q</b>	Gln	Glutamin
<b>R</b>	Arg	Arginin
<b>S</b>	Ser	Serin
<b>T</b>	Thr	Threonin
<b>V</b>	Val	Valin
<b>W</b>	Try	Tryptophan
<b>Y</b>	Tyr	Tyrosin

Die Abkürzungen für SI-Einheiten, Aminosäuren und Nukleotide entsprechen den international verbindlichen Normen.

**Vorträge:****Kursawe J, Klenk HD., Garten W. und Eickmann M. (2007)**

SARS DTV Euro-Asian support Network for the development of successful candidate therapeutics, vaccines & diagnostic assays against SARS-CoV virus; 3rd Year Meeting, Bristol, England

**Garten W., Kursawe J, Klenk HD. und Eickmann M. (2006)**

SARS DTV Euro-Asian support Network for the development of successful candidate therapeutics, vaccines & diagnostic assays against SARS-CoV virus; 2nd Year Meeting, Paris, Frankreich

**Eickmann M., Kursawe J, Gössl M., Klenk HD. und Garten W. (2005)**

SARS DTV Euro-Asian support Network for the development of successful candidate therapeutics, vaccines & diagnostic assays against SARS-CoV virus; 1st Year Meeting 2005, Leiden, Niederlande

**Eickmann M, Kursawe J, Kern A, Stadler K, Sun B, Seng Y, Harada T, Rappuoli R, Klenk HD, Becker S und Garten W. (2006)**

Maturation and proteolytic processing of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated Coronavirus Spike protein. International Conference on SARS one year after the (first) outbreak 2004, Lübeck, Deutschland

**Poster Präsentationen:**

**Kursawe J, Maisa A, Deng H, Garten W, Eickmann M. (2006)**

Characterization of the potential cleavage site of the SARS-CoV Spike protein.

Jahrestagung Gesellschaft für Virologie 2006, Universität München

**Eickmann M, Becker S, Kursawe J, Stadler K, Abrignani S, Rappuoli R, Garten W, Klenk H.D. (2003)**

SARS virus is a close relative of type II coronaviruses.

Jahrestagung Gesellschaft für Virologie 2003, Universität Berlin

**Lebenslauf:****Persönliche Daten**

Name	Jens Kursawe
Geburtsdatum	19.Mai 1976
Geburtsort	Soltau
Adresse	Gabelsbergerstr. 9 35037 Marburg
Familienstand:	verheiratet, 1 Kind

**Schulausbildung**

Aug. 1982 – Juli 1986	Grundschule am Süllberg
Aug. 1986 – Juni 1988	Orientierungsstufe Munster
Aug. 1988 – Juni 1992	Realschule Munster
Aug. 1992 – Juni 1995	Berufliche Schulen des Hochsauerlandkreises in Olsberg: Ausbildung zum Biologisch technischer Assistent und Erwerb der Fachober- schulreife

**Zivildienst**

Sept. 1995 – Sept. 1996	Josefsheim Bigge, Olsberg
-------------------------	---------------------------

**Schulausbildung**

Aug. 1996 – Juni 1998	Sauerland-Kolleg Arnsberg Allgemeine Hochschulreife
-----------------------	--

**Hochschulstudium**

Okt. 1998 – März 2001	Grundstudium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg; Vordiplom
März 2001 – März 2004	Hauptstudium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg

---

April 2002 – Mai 2002	Diplomprüfung (Fächer: Virologie, Mikrobiologie und Genetik) erfolgreich abgelegt
Juni 2003 – März 2004	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Garten
März 2004	Diplom im Fach Biologie

**Berufliche Tätigkeit**

April 2003 – Jan. 2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter: Doktorarbeit am Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg, Direktor Prof. Dr. H.D. Klenk, Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang Garten, Thema: „Charakterisierung des Oberflächen-Glykoproteins des Schweren akuten Atemnotsyndrom Coronavirus (SARS CoV)“
seit Feb. 2008	Scientist bei der Firma QIAGEN Hamburg GmbH

**Praktika und Fortbildungen**

Sep. 2001 – Dez. 2001	Studentische Hilfskraft am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
Okt. 2001 – Nov. 2001	Industriepraktikum bei Aventis Pharma: Qualitätskontrollprüfung für biologische Arzneimittel unter GMP-Bedingungen
Sep. 2004	Fortbildung zum Projektleiter und Beauftragten für Biologische Sicherheit
Mai 2005	Biacore Workshop

---

Aug. 2004 – Dez. 2007	Betreuung der NEW ENGLAND BioLabs (NEB) Freezer Programms: Warenbestandsaufnahme, Bestellung und Logistik der Gesamten NEB Produktpalette für das Biomedizinische Forschungszentrum und das Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg
-----------------------	---

**Wissenschaftliche Förderung**

April 2004 – April 2005	Industrie Kooperation mit Chiron Vaccines
Mai 2005 – Mai 2006	Förderung durch das Chinesisch-deutsche Zentrum für Wissenschaftsförderung: Teil der DFG Präsenz im Ausland
Juni 2006 – Dez. 2007	Forschungsprojekt der Europäischen Union (EU) SARS–DTV: Euro-Asian support Network for the development of successful candidate therapeutics, vaccines & diagnostic assays against SARS-CoV virus

Marburg, den 01. August 2008



**Verzeichnis der Akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die folgenden Damen und Herren:

Amann, Beck, Becker, Brandis-Heep, Bremer, Bohle, Bölker, Buckel, Dobbeltstein, Eickmann, Franken, Feuser, Frenking, Hasenkamp, Hartmann, Heldmaier, Galland, Garten, Gicklhorn, Graumann, Kahmann, Kraus, Kirchner, Klein, Klenk, Knöller, Kost, Maier, Maisner, Mörschel, Müller, Paululat, Plachter, Radsak, Renkawitz-Pohl, Schwarz, Seitz, Slenzka, Schneider, Schuchart, Thauer, Throm, Weber

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. W. Garten für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. H.D. Klenk danke ich für die sehr guten Arbeitsbedingungen am Institut.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl für die Betreuung meiner Dissertation am Fachbereich Biologie bedanken.

Herrn Prof. Dr. E. Bremer und Herrn Prof. Dr. M. Bölker danke ich für die Bereitschaft als Kommissionsmitglieder im vorliegenden Promotionsverfahren zur Verfügung zu stehen.

Herrn Dr. M. Eickmann möchte für sein reges Interesse an meiner Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft und seine wissenschaftlichen Anregungen besonders herzlich danken.

Den folgenden Damen und Herren danke ich für erfolgreiche Kooperation: Dr. K. Stadler, Prof. Dr. B. Sun, Prof. Dr. W. Deng, Prof. Dr. G. Herrler; Prof. Dr. J.D. Berry, Eva Böttcher

Bei den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Garten möchte ich mich für das nette und angenehme Arbeitsklima im Labor bedanken. Ganz speziell möchte ich mich bei meinen ehemaligen direkten Laborkollegen Ina Kraus, Dorothee Gicklhorn, Joanna Baron, Jos Gebhard, Ivan Christian Kurolt, Bianca Tigges, Nina Stock, Maria Haß und Melanie Gössl für die sehr freundliche Atmosphäre bedanken.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für das ausgesprochen nette Arbeitsklima und die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern für die großartige Unterstützung während meines Ausbildungsweges. Danke, dass Ihr immer für mich da seid!

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Nicole.

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation:

**„Charakterisierung des Spike-Proteins des Schweren Akuten Atemnotsyndrom Coronavirus (SARS-CoV)“**

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 01.08.2008

---

(Jens Kursawe)